



**Universidade de
Aveiro
2015**

Departamento de Química

**Andreia Micaela
Rodrigues Falcão**

**Estudos de utilização, tratamento e valorização de
resíduos sólidos: casca de ovo.**



Universidade de
Aveiro
2015

Departamento de Química

**Andreia Micaela
Rodrigues Falcão**

**Estudos de utilização, tratamento e valorização de
resíduos sólidos: casca de ovo.**

Nº Mec.: 45486

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprir os requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia na área de Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e co-orientação da Engenheira Patrícia Margarida de Jesus Fernandes Faustino, Diretora de Ambiente, Qualidade e Higiene e Segurança no Trabalho da DEROVO – DERIVADOS DE OVOS S.A.

Para a melhor mãe do mundo, com amor.

Júri

Presidente

Professora Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier

Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Vogais

Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva (orientador)

Investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo

Professora associada com agregação do Departamento de Química da
Universidade de Aveiro

Agradecimentos Ao professor Jorge Saraiva, pelo acompanhamento do trabalho, pelas palavras de força e ânimo e pela disponibilidade no esclarecimento de dúvidas.

À minha supervisora na empresa Patrícia Faustino, por primeiramente aceitar o meu estágio curricular na instituição em que ambicionava crescer profissionalmente, mas também pelos novos desafios constantes.

A todo o pessoal da empresa, pelo acolhimento e apoio ao longo desta jornada. Não esquecerei o fantástico ambiente no laboratório e a cooperação com o Ricardo Nunes, obrigada do fundo do coração. Ainda no Departamento de Qualidade, o meu sincero agradecimento à Sandra Neves, por acreditar em mim e valorizar o meu trabalho, mas acima de tudo pela amizade. Ao Engenheiro Leonel Conceição pela simpatia quotidiana. Na logística o meu obrigada à Micaela, ao Gil e à Ivone, por me receberem sempre com um sorriso. Na secção do embalamento/enchimento dos produtos, ao Pedro, aos gémeos, ao André, ao Tiago, ao Parafita, à Ana, ao Luís e ao Fernando pela ajuda no controlo do peso e do tamanho dos produtos, bem como na sua disposição na paleta, mas acima de tudo pelos bons momentos. Obrigada a todos os outros com os quais não trabalhei directamente, mas que, de alguma forma, fizeram questão de mudar os meus dias e fizeram de Pombal a minha segunda casa.

À Dra. Cirila Almeida (Médica Veterinária da DIREÇÃO-GERAL DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA), por todo o apoio prestado, desde o fornecimento de informações importantes ao encaminhamento para entidades.

À Engenheira Cristina Bastos (FERREIRA AVES LDA), pela receptividade e explicação do tratamento de produtos da empresa.

À Susana Franklin (OVARGADO S.A.), pela disponibilidade e ajuda na formulação do produto *PrOvo*, ração animal com incorporação de uma fonte natural de cálcio (casca de ovo).

À Alina Francisco (Licenciada em *Design* pela Universidade de Aveiro), pelo desenho da embalagem.

À Lisa Brites, pelo suporte, ajuda na reestruturação e paciência na revisão do trabalho.

Aos meus amigos “da terrinha” de sempre e para sempre, a Ana Regina, a Marina Dias, a Marta Martins, a Edite Gonçalves o meu sentido obrigada por fazerem parte da minha vida.

Aos meus amigos da universidade que ficaram para a vida, a Sílvia, o João, o Pedro, a Carol, a Glória, a Giselda, o Reboleira, a Soraia, a Diana, pelo acompanhamento em todos os aspectos da vida, pelo apoio, mas acima de tudo por serem os meus “biotecs” e eu a vossa Micaela.

A Deus, pela segunda oportunidade. Bem como aos amigos do Grupo de Jovens de Dornelas, da Paróquia Nossa Senhora de Fátima de Dornelas e do movimento Convívios Fraternos, por me tornarem no que sou e pela vossa presença ao longo deste ano em que estive mais distante.

À minha família, mãe, pai, mano, meus queridos avós, madrinha, Carol. Obrigada por nunca terem deixado de acreditar em mim.

E por fim, ao Rafa, a pessoa com que quero partilhar o resto dos meus dias, que nunca me deixou desistir e que mudou por completo o brilho do meu olhar.

Pedra Filosofal

*«Eles não sabem que o sonho
é uma constante da vida
tão concreta e definida
como outra coisa qualquer,
como esta pedra cinzenta
em que me sento e descanso,
como este ribeiro manso,
em serenos sobressaltos,
como estes pinheiros altos,
que em oiro se agitam,
como estas aves que gritam
em bebedeiras de azul.*

*Eles não sabem que o sonho
é vinho, é espuma, é fermento,
bichinho alacre e sedento,
de focinho pontiagudo,
que foça através de tudo
num perpétuo movimento.*

*Eles não sabem que o sonho
é tela, é cor, é pincel,
base, fuste, capitel,
arco em ogiva, vitral,
pináculo de catedral,
contraponto, sinfonia,*

*máscara grega, magia,
que é retorta de alquimista,
mapa do mundo distante,
rosa dos ventos, Infante,
caravela quinhentista,
que é cabo da Boa Esperança,
ouro, canela, marfim,
florete de espadachim,
bastidor, paço de dança,
Colombina e Arlequim,
passarola voadora,
pára-raios, locomotiva,
barco de proa festiva,
alto-forno, geradora,
cisão de átomo, radar,
ultra-som, televisão,
desembarque em foguetão
na superfície lunar.*

*Eles não sabem, nem sonham,
que o sonho comanda a vida.
Que sempre que o homem sonha
o mundo pula e avança
como bola colorida
entre as mãos de uma criança.»*

António Gedeão



*«Egg shell is classified as a waste material by the food industry but is
in fact a highly sophisticated composite» Richard Worrall*

Palavras-chave

Valorização da casca de ovo, ração animal, caracterização microbiana, detecção de patogénios

Resumo

O ovo é um dos alimentos largamente consumidos em todo o mundo devido ao seu conteúdo nutritivo e fácil preparação. A casca, resultante do processamento do ovo, representa cerca de 10% da massa total. Normalmente este resíduo é descartado, sem qualquer tratamento, em aterros e constitui um elevado encargo económico para as empresas.

O presente trabalho teve como principal objetivo fazer um levantamento de novas formas de utilização e valorização da casca de ovo em Portugal, na Comunidade Europeia e noutros países onde a indústria de ovoprodutos está fortemente desenvolvida, com o objetivo de identificar uma solução rentável, a nível económico e ambiental.

Assim, foi realizada a caracterização microbiológica da casca de ovo, para determinar as cargas microbianas de *Escherichia coli*, coliformes totais, enterobactérias totais, *Staphylococcus aureus*, mesófilos totais, bolores e leveduras, e enterococcus. Foi ainda realizado um estudo de detecção de presença ou ausência de patogénios alimentares em 25 g de amostra, no caso de *Salmonella* e *Listeria*. Foi analisada ainda a humidade da casca.

Os mesófilos totais foram, dos microrganismos estudados, os que apresentaram cargas microbianas mais elevadas. No caso da casca esterilizada os valores obtidos apresentaram-se abaixo do limite de detecção para todos os microrganismos, pelo que a esterilização foi eficiente. No que se refere à detecção de patogénios, verificou-se a presença de *Listeria* e/ou *Salmonella* em alguns dos ensaios realizados para a casca triturada. No entanto, não foi detetada a presença de *Listeria* e de *Salmonella*/25g de amostra de casca esterilizada. Relativamente à humidade da casca esterilizada, esta apresentou, de forma geral, valores mais baixos comparativamente com a amostra de casca triturada. Por volumetria foi estimada, na amostra de casca triturada, a percentagem de cálcio como sendo 31,0%.

Deste trabalho resultou como utilização mais promissora da casca de ovo a sua incorporação em rações, como substituto do CaCO_3 usado atualmente.

Keywords

Eggshell recovery, animal food, microbial characterization, pathogen detection

Abstract

Eggs are one of the most consumed foods worldwide due to its nutritive content and easy confection. The eggshell, resultant from egg processing, represents about 10% of the total mass. Usually, this solid waste is discarded without any treatment in landfills being an important economic burden for enterprises.

The main objective of the present work was to conduct a survey on new ways of using and valuing eggshell in Portugal, European Community and other countries where the egg industry is strongly developed, aiming to identify a cost-effective solution, both in an economical and environmental level.

Thus, microbiological characterization of eggshell samples was performed, in order to determine the microbial loads of *Escherichia coli*, total coliforms, total enterobacteria, *Staphylococcus aureus*, total aerobic mesophiles, yeasts and moulds, and enterococcus. It was also conducted a study for detection of presence or absence of food pathogens, such as *Salmonella* and *Listeria*, in 25 g of food samples. The humidity of eggshell samples was also analyzed.

Total aerobic mesophiles were the studied microorganisms with the highest microbial loads. In the case of sterilized eggshell, the obtained values were below the detection limit for all microorganisms, which means that sterilization was effective to achieve microbial inactivation. Regarding pathogen detection, the presence of *Listeria* and/or *Salmonella* was detected in some of the analyzed crushed eggshells. However, these microorganisms were not detected on sterilized samples (25 g). Concerning the humidity of sterilized eggshell, this parameter resulted, in general, in lower values when compared to crushed eggshell samples. The percentage of calcium in eggshell samples was estimated through volumetry to be 31.0%.

The incorporation of the crushed eggshell into feeds, as a replacement for the currently used CaCO_3 , was identified in this work as the most promising use of eggshells.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABELAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Estado da Arte	3
1.1.1. O ovo	3
1.1.1.1. Biossíntese.....	4
1.1.1.1.1. Biossíntese do Ovo.....	4
1.1.1.1.2. Biossíntese da Casca	6
1.1.1.2. Estrutura	7
1.1.1.2.1. Estrutura do Ovo	7
1.1.1.2.2. Estrutura da Casca.....	8
1.1.1.3. Composição.....	9
1.1.1.3.1. Composição do Ovo	9
1.1.1.3.1.1. Macronutrientes.....	10
1.1.1.3.1.2. Micronutrientes	11
1.1.1.3.2. Composição da Casca.....	12
1.1.2. Consumidor de ovos: atitudes, perceções e comportamento.....	12
1.1.3. Fatores de risco inerentes ao consumo de ovo	13
1.1.3.1. <i>Salmonella</i>	13
1.1.3.2. Colesterol	15
1.1.4. Benefícios inerentes ao consumo de ovos	16
1.1.5. Ovoprodutos	17
1.1.5.1. Funcionalidades e propriedades industriais relevantes.....	17
1.1.5.2. Inovação e processamentos	18
1.1.6. Aplicações da casca de ovo: matéria-prima industrial	20
1.2. Entidade de Acolhimento do estágio.....	28
1.2.1. Identidade e contextualização sociocultural.....	28
1.2.2. Gama de produtos.....	30
1.2.3. Descrição do processo produtivo na DEROVO-Derivados de ovos S.A.....	30
II. CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA & OBJETIVOS.....	33

III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1. Substâncias químicas.....	39
3.2. Recolha e preparação de amostras.....	39
3.2.1. Casca triturada.....	39
3.2.2. Casca esterilizada	40
3.3. Análises microbianas.....	40
3.3.1. Preparação da amostra e diluição	40
3.3.2. Preparação dos meios de cultura e de BPW	41
3.3.3. Contagem de <i>Escherichia coli</i> e restantes coliformes	41
3.3.4. Contagem de enterobactérias totais	41
3.3.5. Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	42
3.3.6. Contagem de mesófilos totais	42
3.3.7. Contagem de bolores e leveduras.....	43
3.3.8. Contagem de enterococcus totais	43
3.4. Detecção de <i>Salmonella</i> e <i>Listeria</i>	44
3.5. Análises físico-químicas	45
3.5.1. Humidade da casca.....	45
3.6. Análise de parâmetros da composição da casca.....	46
IV. APRESENTAÇÃO DE UMA PROPOSTA À ENTIDADE DE ACOLHIMENTO.....	47
4.1. Legislação	50
4.2. Processamento da casca de ovo.....	50
4.3. Desenvolvimento de uma ração com incorporação de casca de ovo - <i>PrOvo</i>	51
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1. Análises microbianas.....	57
5.1.1. <i>Escherichia coli</i>	57
5.1.2. Coliformes.....	58
5.1.3. Enterobactérias totais	59
5.1.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	59
5.1.5. Mesófilos totais	60
5.1.6. Bolores e leveduras	61
5.1.7. Enterococcus	62
5.2. Detecção de <i>Salmonella</i> e <i>Listeria</i>	63
5.2.1. <i>Salmonella</i>	63

5.2.2. <i>Listeria</i>	65
5. 3. Análises físico-químicas	66
5. 3.1. Humidade da casca.....	66
5.4. Análise de parâmetros constituintes da casca de ovo.....	67
VI. CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO.....	69
VII. OUTROS TRABALHOS.....	73
VIII. REFERÊNCIAS	77
ANEXOS.....	i
Anexo A – Gama de produtos comercializada pelo GRUPO DEROVO	ii
Anexo B – Fluxograma produtivo de ovoprodutos líquidos, adaptado de Agência Portuguesa do Ambiente (2011)	iv
Anexo C – Fluxograma produtivo de ovo cozido, adaptado de Agência Portuguesa do Ambiente (2011)	vi
Anexo D – Preparação dos meios de cultura necessários para a caracterização microbiológica da casca de ovo e de BPW	vii
Anexo E – Princípio de funcionamento do mini VIDAS®	ix
Anexo F – Calibração – Recalibração do mini VIDAS®	xi
Anexo G – Procedimentos experimentais para a deteção de <i>Salmonella</i> e de <i>Listeria</i>	xii
Anexo H – Matérias-primas de origem animal para alimentação animal.....	xiii
Anexo I – Possibilidade de tratamento da casca de ovo considerando as quantidades geradas pela empresa. Características, preço e condições de pagamento do Shell Dryer R200 (OVOBEL®, BRUGES, BÉLGICA).....	xv
Anexo J – Cálculos para determinação da composição da ração com incorporação de casca de ovo: <i>PrOvo</i>	xvii
Anexo K – Planificação das embalagens <i>PrOvo</i>	xviii
Anexo L – Relatórios impressos pelo mini VIDAS® na deteção de <i>Salmonella spp.</i> em amostras de casca triturada e esterilizada.....	xix
Anexo M – Relatórios impressos pelo mini VIDAS® na deteção de <i>Listeria spp.</i> em amostras de casca triturada e esterilizada.....	xxii

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Formação sequencial do ovo no trato genital da galinha. Representação do ovário da galinha (em cima) e do oviduto (em baixo), bem como as fases de formação do ovo e respetiva duração (em horas). Os folículos ovarianos são folículos pré-ovulatórios, adaptado de Nys e Guyot (2011).	5
Figura 2 - Estrutura do ovo de galinha, adaptada de Mine e Zhang (2013).	7
Figura 3 - a) Esquema de um corte transversal de casca de ovo, as linhas representam a orientação preferencial dos cristais de calcite b) Ilustração de um corte transversal de casca de ovo. Adaptado de Baláz (2014); Guru e Dash (2014) e de Nys e Guyot (2011).	8
Figura 4 - Coloração falsa de microscopia eletrónica de transmissão de uma colónia de bactérias, <i>Salmonella enteritidis</i> ; adaptada de Dowsett (2014).	13
Figura 5 - Ovoprodutos comercialmente disponíveis em vários países.	19
Figura 6 - Logótipo do GRUPO DEROVO.	28
Figura 7 - Marcos determinantes para a empresa, adaptado de Deroovo Group (2010, 2014).	29
Figura 8 - Trituradora / centrífuga (Coenraadts Machinefabriek B.V.®, Zaandam, Holanda).	39
Figura 9 - Processo de esterilização, ilustrando a) a autoclave (UNICLAVE88®, Cacém, Portugal) b) as amostras de casca após esterilização.	40
Figura 10 - Ilustração de equipamento a) VIDAS®Heat and Go (bioMérieux®, Lyon, França): um sistema de aquecimento a seco, concebido para aquecer 12 barretes simultaneamente; b) mini VIDAS® (bioMérieux®, Lyon, França), uma versão compactada do sistema VIDAS®, com computador, teclado e impressora incorporados e dois compartimentos independentes (A e B), cada um permitindo 6 testes, pelo que possibilita uma análise em simultâneo de 12 barretes.	44
Figura 11 - Analisador de humidade avançado (Mettler-Toledo HB43-S Halogen, Barcelona, Espanha).	45
Figura 12 - Fluxograma representativo das etapas inerentes ao desenvolvimento da proposta.	49
Figura 13 - <i>Design</i> da embalagem do produto.	53
Figura 14 - Contagens microbianas de <i>Escherichia coli</i> presente na casca triturada (Log_{10} UFC/g), resultantes dos ensaios realizados a 18/mar, 25/mar, 31/mar e 08/abr. Os valores representados constituem a média de duas condições independentes, no caso o horário a que foi feita a recolha das amostras (9:50 h e 14:50 h) e os ensaios foram realizados em duplicado (duas réplicas). As barras de erro representam o desvio padrão. Foi ainda realizada a contagem microbiana da casca esterilizada em autoclave a 133 °C durante 15 minutos, os resultados obtidos encontravam-se abaixo do limite de deteção ($< 1,00 \text{ Log}_{10}\text{UFC/g}$).	57
Figura 15 - Contagens microbianas de coliformes (Log_{10} UFC/g) resultantes dos ensaios realizados a 18/mar, 25/mar, 31/mar e 08/abr. Os valores representados constituem a média de duas condições independentes (a hora a que foi feita a recolha das amostras) e os ensaios foram realizados em duplicado. As barras de erro representam o desvio padrão. Para a casca esterilizada em autoclave a 133 °C durante 15 minutos os resultados obtidos encontravam-se abaixo do limite de deteção ($< 1,00 \text{ Log}_{10}\text{UFC/g}$).	58
Figura 16 - Contagens microbianas de enterobactérias totais (Log_{10} UFC/g) de amostras de casca triturada (invólucro e respetivas membranas aderidas), resultantes dos ensaios efetuados a 18/mar, 25/mar, 31/mar e 08/abr. Os valores representados constituem a média de duas condições independentes (9:50 h e 14:50 h) e foram efetuadas duas réplicas. As barras de erro indicam o	

desvio padrão. Os resultados obtidos encontravam-se abaixo do limite de deteção ($< 1,00 \text{ Log}_{10}\text{UFC/g}$) para a casca esterilizada em autoclave a 133°C durante 15 minutos.	59
Figura 17 - Contagens microbianas de <i>Staphylococcus aureus</i> ($\text{Log}_{10} \text{ UFC/g}$) de amostras de casca triturada (invólucro e dupla membrana aderida), resultantes dos ensaios efetuados a 18/mar, 25/mar, 31/mar e 08/abr. Os valores representados constituem a média de duas condições independentes e os ensaios foram feitos em duplicado. As barras de erro representam o desvio padrão. Os resultados obtidos para a casca esterilizada (133°C , 15 min) encontravam-se abaixo do limite de deteção ($< 1,00 \text{ Log}_{10}\text{UFC/g}$).	60
Figura 18 - Contagens microbianas de mesófilos aeróbios totais ($\text{Log}_{10} \text{ UFC/g}$) de amostras de casca triturada, resultantes de quatro ensaios. Os valores representados constituem a média de duas condições independentes e as determinações foram feitas em duplicado (duas réplicas). As barras de erro representam o desvio padrão. Os resultados obtidos para amostras de casca esterilizada encontravam-se abaixo do limite de deteção ($< 1,00 \text{ Log}_{10}\text{UFC/g}$).	61
Figura 19 - Contagens microbianas de bolores e leveduras ($\text{Log}_{10} \text{ UFC/g}$) de amostras de casca triturada, resultantes de diferentes ensaios. Os resultados apresentados são relativos à média de duas condições independentes (09:50 h e 14:50 h) e de duas réplicas. As barras de erro representam o desvio padrão. A casca esterilizada resultou em valores abaixo do limite de deteção ($< 1,00 \text{ Log}_{10}\text{UFC/g}$).	62
Figura 20 - Contagens microbianas de enterococcus totais ($\text{Log}_{10} \text{ UFC/g}$) de amostras de casca de ovo triturada, resultantes de diferentes ensaios. Os resultados apresentados são referentes à média de duas condições independentes (09:50 h e 14:50 h) e de duas réplicas. As barras de erro representam o desvio padrão. A esterilização da casca resultou em valores inferiores ao limite de deteção ($< 1,00 \text{ Log}_{10}\text{UFC/g}$).	63
Figura 21 - Deteção de presença ou ausência (%) de <i>Salmonella spp.</i> em 25 g de amostras de casca triturada (invólucro e dupla membrana) recolhidas a) às 09:50 h b) às 14:50 h. A mesma determinação foi efetuada para amostras de casca esterilizada em autoclave (133°C , 15 min) e, em ambos os casos, obteve-se 100% de ausência do agente patogénico/25g de casca esterilizada.	65
Figura 22 - Percentagem de humidade em diversas amostras de casca de ovo triturada e esterilizada. Os valores representados constituem a média de duas medições. As barras de erro representam o desvio padrão.	67
Figura 23 - Outros trabalhos desenvolvidos na entidade de acolhimento do estágio.	75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de vários tipos de ovos crus, adaptada de McNamara e Thesmar (2005). ..	4
Tabela 2 - Algumas funções relevantes do ovo nos sistemas alimentares, adaptado de Vaclavik e Christian (2003).	18
Tabela 3 - Vantagens e limitações dos principais tipos de ovoprodutos, adaptada de Linden e Lorient (2007)	19
Tabela 4 - Estudos e respetivas aplicações da casca de ovo e/ou membranas aderidas em diversificadas áreas.	22
Tabela 5 - Processos patenteados de separação das membranas aderidas à casca, bem como utilização do invólucro ou das membranas separadamente.....	24
Tabela 6 - Legislação e estratégias seguidas por alguns dos principais países produtores de ovoprodutos da CE.....	26
Tabela 7 - Legislação e estratégias seguidas por alguns dos principais países produtores de ovoprodutos não constituintes da CE.....	27
Tabela 8 - Parâmetros identificativos da entidade de acolhimento do estágio: DEROVO - DERIVADOS DE OVOS S.A., adaptado de Agência Portuguesa do Ambiente (2011) e de Deroovo Group (2010, 2014).....	29
Tabela 9 - Análises externas de parâmetros da composição da casca de ovo e métodos de análise.	46
Tabela 10 - Composição da ração <i>PrOvo</i> , resultante de uma incorporação de 3% de casca de ovo no Produto Transformado (FERREIRA AVES LDA).	52
Tabela 11 - Determinação de alguns parâmetros da composição da casca de ovo (análises efetuadas pela EMPRESA SUBCONTRATADA B).....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

a_w	Atividade da água
BP RPF	Gelose baird parker com fibrinogênio de plasma de coelho (<i>Baird parker agar + Rabbit plasma fibrinogen</i>)
BPW	Água peptonada (<i>Buffered peptone water</i>)
CaCO₃	Carbonato de cálcio
CE	Comunidade Europeia
COLI ID-F	Gelose chromID™ Coli (<i>ChromID Coli Agar</i>)
CVD	Doenças cardiovasculares (<i>Cardiovascular diseases</i>)
DGAV	Direção-Geral de Alimentação e Veterinária
ELFA	Ensaio imunoenzimático fluorescente (<i>Enzyme Linked Fluorescent Assay</i>)
FAO	Organização para a Alimentação e Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization</i>)
GAG	Glicosaminoglicano
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low density lipoprotein</i>)
PCA	Agar padrão para contagem (<i>Plate count agar</i>)
RBCA	Agar rosa de bengala com cloramfenicol (<i>Rose bengal chloramphenicol agar</i>)
Rpm	Rotações por minuto
TS	Caldo Triptona sal ou Solução Peptona-sal
UFC	Unidades formadoras de colónias
VRBG-F	Gelose de glucose com cristal violeta, vermelho neutro e bÍlis (<i>Violet red bile glucose agar</i>)

I. INTRODUÇÃO

1.1. Estado da Arte

1.1.1. O ovo

O ovo é uma fonte natural de proteína e de outros nutrientes de elevada qualidade, possibilitando uma fácil digestão e o fornecimento de uma porção significativa dos nutrientes requeridos para o crescimento diário e manutenção dos tecidos do corpo (**Belitz et al., 2009**).

Ao longo dos anos e pelas diversas propriedades funcionais que apresenta, o ovo tornou-se um ingrediente essencial, utilizado das mais diversas formas nas nossas cozinhas e na indústria alimentar (**Belitz et al., 2009**). Esta estrutura biológica natural oferece proteção para o desenvolvimento do embrião, nos sistemas alimentares desempenha inúmeras funções e é considerada um recurso pouco dispendioso em todo o mundo (**Vaclavik e Christian, 2003**).

Atualmente uma enorme variedade de ovos de diferentes espécies de aves estão disponíveis comercialmente, sendo o ovo de galinha o mais largamente consumido mundialmente (**McNamara e Thesmar, 2005; Vaclavik e Christian, 2003**). De agora em diante o termo “ovo” sem especificação a que espécie pertence, descrito ao longo desta tese, é relativo a ovo de galinha.

Os avanços tecnológicos do século XX possibilitaram a intensa investigação da composição química e das propriedades funcionais do ovo. A compreensão das propriedades funcionais do ovo e a química inerente a essas características é determinante na indústria alimentar para desenvolver novos produtos ou melhorar a qualidade dos já existentes. A indústria alimentar também procura prolongar o tempo de prateleira, preservar a qualidade nutritiva durante o período de armazenamento e a incorporação noutros produtos comercializáveis como bolos e gelados. No entanto é necessário considerar que o processamento dos alimentos induz alterações químicas dos componentes do ovo e das suas propriedades funcionais, que podem ser desejáveis ou não (**Mine e Zhang, 2013**).

A **Tabela 1** permite a comparação do conteúdo calórico, proteico, lipídico e do colesterol presente por parte comestível de ovo de variadas espécies.

Tabela 1 - Composição de vários tipos de ovos crus, adaptada de **McNamara e Thesmar (2005)**.

Nutrientes	Espécies (peso médio do ovo)				
	Codorniz	Galinha	Pato	Peru	Ganso
	(9 g)	(50 g)	(70 g)	(79 g)	(144 g)
Água (g)	74,35	75,84	70,83	72,50	70,43
Energia					
kJ	663	617	776	716	775
kcal	158	147	185	171	185
Proteína (g)	13,05	12,58	12,81	13,68	13,87
Lípidos (g)	11,09	9,94	13,77	11,88	13,27
Ácidos gordos saturados (g)	3,56	3,10	3,68	3,63	3,60
Ácidos gordos monoinsaturados (g)	4,32	3,81	6,53	4,57	5,75
Ácidos gordos polinsaturados (g)	1,32	1,36	1,22	1,66	1,67
Colesterol (mg)	844	423	884	933	852

1.1.1.1. Biossíntese

1.1.1.1.1. Biossíntese do Ovo

A formação do ovo no trato genital da galinha ocorre sequencialmente (ver **Figura 1**). O tempo decorrido em cada etapa varia consoante os autores. De acordo com **Nys e Guyot (2011)** e, como ilustra a **Figura 1**, a secreção da membrana vitelina é uma etapa que demora sensivelmente 18 minutos, da clara 4 horas, da membrana da casca de ovo 1 hora e a formação da casca de ovo 19 horas. Assim, o tempo total necessário para a formação completa do ovo é aproximadamente 24 horas (**International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2005**).

O ovo é concebido nos ovários e no oviduto (**Sparks, 2014**). O ovário de uma galinha poedeira é constituído por muitos folículos de diferentes tamanhos (**Bellairs e Osmond, 2014**). Primeiramente, os ovócitos iniciam o desenvolvimento, no interior de um folículo branco vascularizado, ou seja circundado pelas veias da galinha. Mais tarde, 7 a 10 dias antes da ovulação, o folículo amarelo inicia o crescimento na base do folículo branco, culminando na deposição da parte amarela do ovo (**Mine e Zhang, 2013**). Os componentes da gema são transportados mediante a circulação sanguínea para os ovários, onde a gema é revestida pela membrana perivitelina. Após esta etapa, dá-se a sua orientação para o oviduto pelo infundíbulo. Imediatamente após a entrada no

oviduto ocorre a deposição da segunda membrana vitelina (Sparks, 2014). A parte mais longa do oviduto é o magno, também denominada como zona secretora da clara (Mine e Zhang, 2013). Após a passagem no magno, o ovo segue para o istmo, onde as membranas fibrosas da casca são depositadas. Estas membranas são essencialmente constituídas por colagénio tipo X. Pouco depois da entrada do ovo no istmo ocorre a passagem dos iões de cálcio do sangue da galinha para as membranas da casca de ovo, com a formação de colunas de calcite (cristais de carbonato de cálcio), separadas por

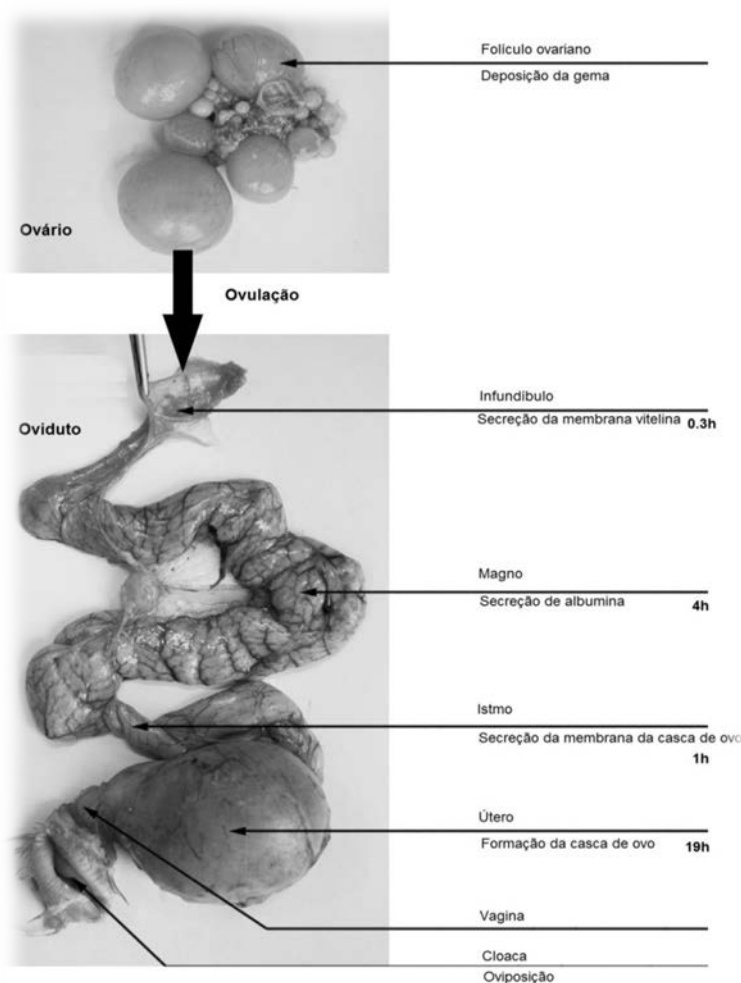


Figura 1 - Formação sequencial do ovo no trato genital da galinha. Representação do ovário da galinha (em cima) e do oviduto (em baixo), bem como as fases de formação do ovo e respetiva duração (em horas). Os folículos ovarianos são folículos pré-ovulatórios, adaptado de Nys e Guyot (2011).

poros, que posteriormente permitem a troca de gases entre o interior e o exterior do ovo. Em simultâneo, uma pequena quantidade de material orgânico é excretada, formando uma teia que desempenha um papel importante na calcificação. Durante a sua permanência na glândula, o ovo gira lentamente, contribuindo para assegurar uma distribuição uniforme dos iões cálcio (Bellairs e Osmond, 2014). O ovo passa 18 a 19 horas no útero (cerca de 75% do tempo total que está no oviduto) que é onde ocorre a formação da casca (Mine e Zhang, 2013; Nys e Guyot, 2011; Sparks, 2014). A biossíntese da casca é descrita com mais detalhe de seguida.

1.1.1.1.2. Biossíntese da Casca

A casca é um constituinte essencial do ovo e tem uma estrutura altamente organizada e porosa, que possibilita as trocas de água e gases, fornece cálcio para o desenvolvimento embrionário e protege o ovo das infeções microbianas (**Mine e Zhang, 2013**). A estrutura do poro varia de acordo com a espécie das aves, o que poderá dever-se a adaptações ao ambiente de nidificação (**Bellairs e Osmond, 2014**). A casca de ovo de galinha possui entre 7000 a 17000 poros de aproximadamente 10 µm de diâmetro, essenciais para a troca de gases supracitada. A síntese da casca é regulada pelo sistema endócrino da galinha poedeira, que inclui estrogénios, calcitonina, hormona da paratiroide e a 1,25-dihidroxitamina D3 (**Mine e Zhang, 2013**). A primeira etapa na formação da casca ocorre no istmo e consiste na deposição das membranas (**Bellairs e Osmond, 2014; Mine e Zhang, 2013**). A matriz orgânica da membrana da casca é fundamentalmente constituída por proteína fibrilar, que é formada por uma rede de ligações cruzadas de dissulfureto e inclui colagénios tipos I, V e X. Estes componentes são sintetizados e libertados por numerosas células glandulares tubulares e outras células localizadas no istmo (**Mine e Zhang, 2013**). Imediatamente após a oviposição, é depositada a cutícula, que consiste numa camada muito fina que envolve a casca (**Sparks, 2014**).

A biomineralização da casca é um processo distinto do que ocorre aquando da mineralização de tecidos de outras espécies, tanto em vertebrados como invertebrados. Tipicamente, o processo de mineralização que ocorre em outras espécies consiste na interação de elementos com colagénio e elementos sem colagénio com a fase mineral, o que resulta na formação de uma matriz bifásica calcificada e no controlo da deposição de minerais. A casca diverge destes típicos processos de mineralização, pois apresenta uma separação espacial entre a parte orgânica e os componentes minerais, através da qual a membrana interage com agregados orgânicos conhecidos como protuberâncias mamilares ou botões mamilares. A calcificação é um processo sequencial relacionado com as etapas de ovulação. Diversas alterações bioquímicas estão associadas com a biomineralização da casca, que incluem as variações na composição da matriz proteica e a formação da calcite no fluido uterino (**Mine e Zhang, 2013**).

1.1.1.2.Estrutura

1.1.1.2.1. Estrutura do Ovo

A estrutura do ovo (ver **Figura 2**) é subdividida em gema, clara, calaza, câmara-de-ar, membranas da casca (interna e externa) e casca (**Mine e Zhang, 2013**).

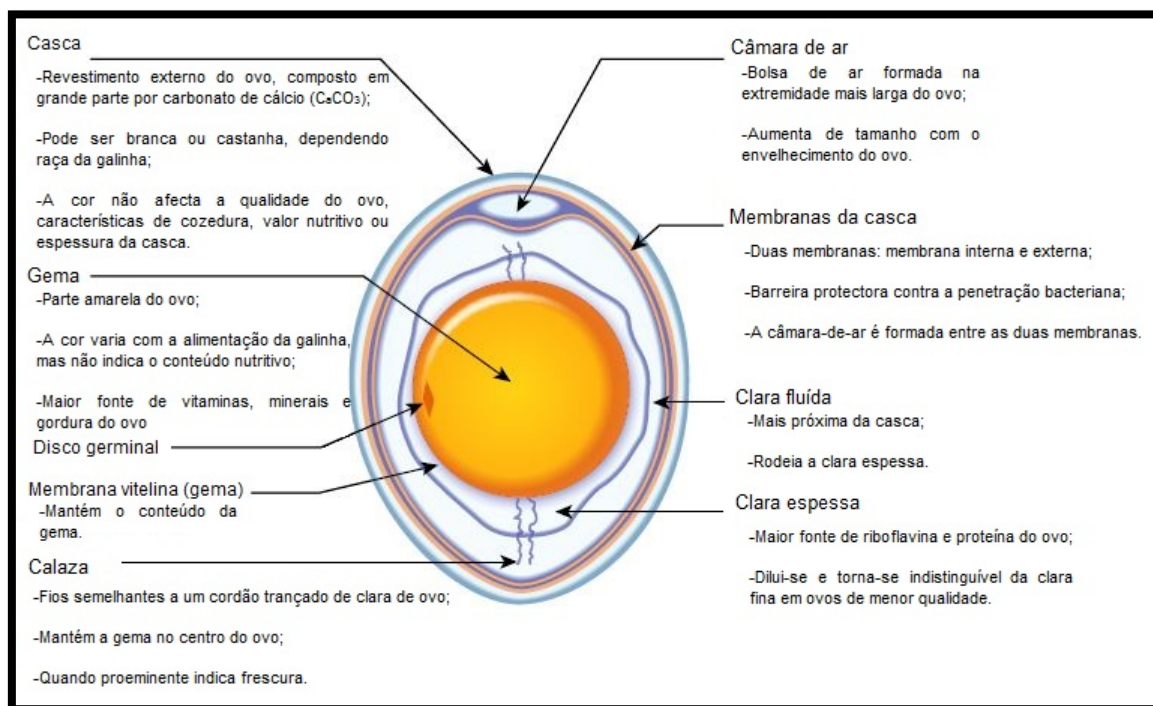


Figura 2 - Estrutura do ovo de galinha, adaptada de **Mine e Zhang (2013)**.

A macroestrutura da gema é constituída pela membrana vitelina (membrana de fibra proteica fina (10 μm)) e pela gema (emulsão de gordura em água com sensivelmente 50% de extrato seco, que pode ter uma tonalidade mais escura ou mais clara/suave) (**Belitz et al., 2009; Cherian, 2011**). O colesterol total do ovo e a maioria das gorduras estão presentes na gema. Esta estrutura, comparativamente com a clara, tem mais nutrientes e contém todas as vitaminas conhecidas, à exceção da vitamina C. A gema do ovo contém três tipos de lípidos (triglicerídeos, fosfolípidos e esteróis). A gordura e a maioria do conteúdo proteico estão na forma de partículas da fase aquosa (em esferas de grandes dimensões, grânulos e micelas). A proteína é fundamentalmente vitelina e está presente num complexo de lipoproteína como lipovitelina. Os pigmentos, nomeadamente a xantofila e os carotenoides, provêm da alimentação animal e afetam a coloração da gema (**Vaclavik e Christian, 2003**).

A clara é uma solução aquosa de várias proteínas, que se caracteriza por ser um fluido pseudoplástico, uma vez que a sua viscosidade depende da tensão de cisalhamento. Esta estrutura apresenta diferentes camadas, que diferem no que diz respeito à viscosidade (Belitz et al., 2009).

1.1.1.2.2. Estrutura da Casca

A casca (ver **Figura 3**) consiste em cristais de calcite ou carbonato de cálcio (CaCO_3) embebidos numa matriz orgânica ou estrutura de fibras proteicas entrelaçadas e massas esféricas (*complexos proteínas-mucopolissacarídeos*) numa proporção de 50:1. Outros constituintes que estão presentes em pequenas quantidades são o carbonato de magnésio e fosfatos (Belitz et al., 2009; Belitz e Grosch, 1988; Li-Chan et al., 1995).

Considerado um material poroso natural, a sua estrutura altamente ordenada, tem sido uma área fascinante de pesquisa nos últimos anos (Guru e Dash, 2014). Os poros presentes na casca contribuem para a perda de CO_2 e humidade, e entrada de O_2 no ovo (Vaclavik e Christian, 2003). Estruturalmente é subdividida em 5 diferentes camadas: membranas da casca (interna e externa), camada mamilar, camada em paliçada, camada de cristal vertical e cutícula (Guru e Dash, 2014).

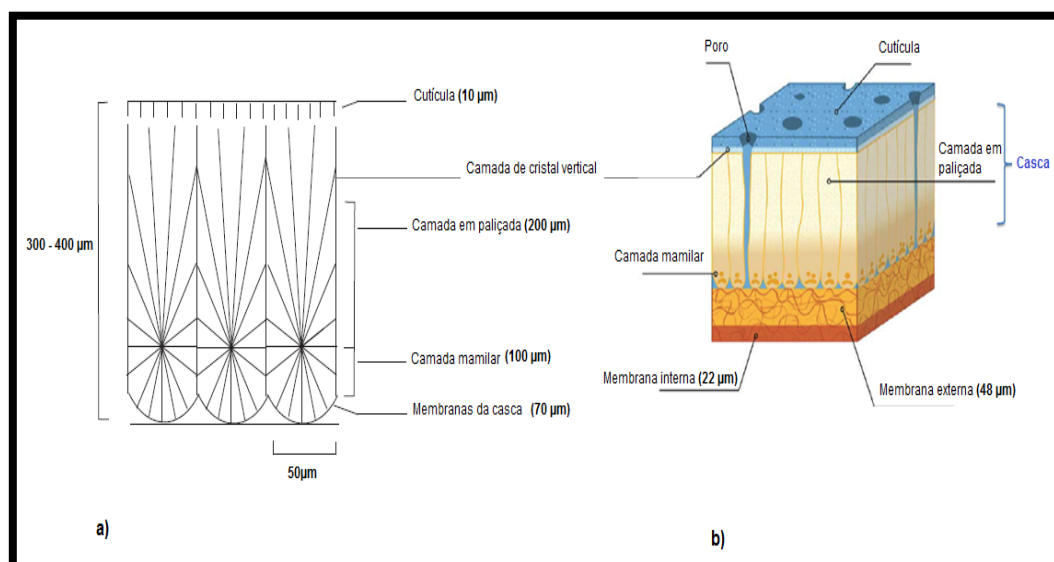


Figura 3 - a) Esquema de um corte transversal de casca de ovo, as linhas representam a orientação preferencial dos cristais de calcite **b)** Ilustração de um corte transversal de casca de ovo. Adaptado de Baláz (2014); Guru e Dash (2014) e de Nys e Guyot (2011).

As duas membranas finas estão no interior da casca (a membrana externa unida à casca e a membrana interna que se move com o conteúdo do ovo), sendo separadas pela câmara-de-ar, que se forma na extremidade mais larga do ovo (**Vaclavik e Christian, 2003**). Na camada mamilar considera-se que os cristais de calcite são de grandes dimensões ($> 1,0$ mm) e têm orientação aleatória. Na camada em paliçada, a maior porção calcificada da casca, o crescimento dos cristais de calcite ocorre com aspeto alongado e perpendicular à superfície (**Guru e Dash, 2014**). Consequentemente, os cristais de calcite, dispostos em colunas ou paliçadas, estendem-se ao longo de quase toda a espessura do invólucro e estão extremamente empacotados. A camada em paliçada é contínua com a camada de cristal vertical, que consiste numa camada fina imediatamente abaixo da cutícula (**Bellairs e Osmond, 2014**). A cutícula proteica sela parcialmente os poros, mas mantém-se permeável aos gases enquanto restringe a penetração de microrganismos (**Belitz et al., 2009; Bellairs e Osmond, 2014**). O ovo é portanto constituído por determinadas estruturas que contribuem para retardar a contaminação microbiana, que se dispõem por ordem decrescente de importância: cutícula $>$ membrana interna $>$ casca $>$ membrana externa. A quebra do ovo compromete a resistência à contaminação, dado que permite a fácil entrada de microrganismos patogénicos e deteriorativos (**International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2005**).

1.1.1.3. Composição

1.1.1.3.1. Composição do Ovo

Os principais constituintes do ovo são a gema (28 - 29%), a clara (60 - 63%), e a casca (9 - 11%), perfazendo assim a porção comestível correspondente a 89 - 91% (**Cherian, 2011; Mine e Zhang, 2013**). Este alimento é composto por uma variedade de componentes químicos, tais como água, proteínas (com todos os aminoácidos essenciais numa proporção equilibrada), ácidos gordos, sais minerais, vitaminas, pigmentos e, numa menor quantidade, hidratos de carbono (glicose, sacarose, frutose, lactose, maltose e a galactose) (**Mine e Zhang, 2013; Vaclavik e Christian, 2003**).

A composição da gema é aproximadamente 16% de proteína, 34% de lípidos, 0,1% de hidratos de carbono e 1% de cinzas (**Sparks, 2014**). Durante o armazenamento

e posterior envelhecimento do ovo, esta componente expande e perde a viscosidade devido ao aumento do conteúdo de água que se movimenta devido à maior concentração de sólidos na gema do que na clara (**Vaclavik e Christian, 2003**).

A clara é composta por diferentes camadas: aproximadamente 23,3% consistem numa camada fluída interligada com a membrana interna, todavia uma grande porção (57,3%) consiste numa camada viscosa ou espessa; 16,8% são constituídos por uma fina camada branca interior, e 2,7% constituem a calaza. A composição das distintas camadas é semelhante, contendo 88% de água, 10% de proteína, 0,03% de lípidos, 0,6% de hidratos de carbono e 0,5% de cinzas. O que as distingue é o conteúdo de ovomucina, que varia entre 1,2% e 7,5%, se a clara for fluída ou mais espessa, respetivamente (**Sparks, 2014**). As proporções das camadas de clara são afetadas pela espécie da galinha, condições ambientais, tamanho do ovo e taxa de produção. Em ovos frescos, a clara espessa cobre a clara fina interior e a calaza mantém a gema no centro do ovo, de modo a que em ovos de menor qualidade a clara espessa se torne indistinguível da clara fluída (**Mine e Zhang, 2013; Vaclavik e Christian, 2003**).

1.1.1.3.1.1. Macronutrientes

Entre os macronutrientes, os lípidos são um dos principais componentes do ovo, compreendendo entre 5,0 - 5,5 g num ovo de 60 g. Quase todos os lípidos estão presentes na gema (aproximadamente 4,5 g) na forma de complexos de lipoproteínas; no entanto, níveis vestigiais de lípidos têm sido encontrados na clara (**Cherian, 2011; McNamara e Thesmar, 2005**). Os lípidos da gema incluem lípidos neutros ou triacilglicerol, fosfolípidos e colesterol livre, sendo os dois primeiros os maiores componentes compreendendo 65 e 32%, respetivamente. Os fosfolípidos, devido à sua natureza anfipática, são amplamente utilizados como emulsionantes no cozimento, indústria farmacêutica, alimentação animal e indústrias de cosméticos (**Cherian, 2011**).

As proteínas, outro macronutriente constituinte do ovo, representam aproximadamente, 6 g/ovo. As proteínas do ovo estão distribuídas na gema e na clara e são proteínas completas, com um bom equilíbrio de aminoácidos essenciais e cerca de 97% de digestibilidade (**Cherian, 2011; McNamara e Thesmar, 2005**). Os aminoácidos absorvidos estão disponíveis para (1) síntese de proteínas no corpo para crescimento e manutenção de tecidos, e (2) substituir as proteínas perdidas. As proteínas

do ovo são ingredientes altamente desejáveis em panificação e nas indústrias alimentar e farmacêutica, devido às propriedades multifuncionais (gelificação, emulsificação, formação de espuma, aglutinantes) e propriedades farmacológicas (**Cherian, 2011**).

A clara de ovo contém cerca de 11% de proteínas. As principais proteínas da clara de ovo são ovalbumina (54%), ovotransferrina (14%), ovomucóide (11%), ovomucina (3,5%), lisozima (3,5%), e as globulinas (8%). Algumas das proteínas da clara de ovo têm atividade biológica como é o caso de enzimas (por exemplo a lisozima, com propriedades antibacterianas), inibidores de enzimas (como a ovomucóide) e agentes formadores de complexos para algumas coenzimas (por exemplo flavoproteína e avidina) (**Belitz et al., 2009; Cherian, 2011**).

A maioria das proteínas da gema está na forma de lipoproteínas. A gema contém ainda outras proteínas imunitárias, tais como as imunoglobulinas, sendo a predominante a imunoglobulina Y (IgY) (**Cherian, 2011**).

1.1.1.3.1.2.Micronutrientes

Os micronutrientes do ovo incluem vitaminas solúveis em água e em gordura, minerais e pigmentos. A grande maioria das vitaminas solúveis em gordura (como é o caso das vitaminas A, D e E) está concentrada na gema e a maioria das vitaminas solúveis em água (que incluem a vitamina B₁₂, biotina, folacina, piridoxina, riboflavina, tiamina) na gema e na clara (**Cherian, 2011; McNamara e Thesmar, 2005; Vaghefi, 2008**). No que se refere aos minerais, o ovo é considerado uma fonte de todos os minerais essenciais à vida, particularmente o ferro presente na gema (**McNamara e Thesmar, 2005**). A composição mineral do ovo é: 25 mg de cálcio, 0,024 mg de iodo, 0,72 mg de ferro, 5,0 mg de magnésio, 0,013 mg de manganês, 89 mg de fósforo, 64 mg de potássio, 63 mg de sódio e 0,55 mg de zinco (**Vaghefi, 2008**). Adicionalmente, outros nutrientes e pigmentos compreendem 0,02% do ovo.

Os hidratos de carbono totais presentes no ovo, na clara e na gema são, respetivamente, 0,61, 0,34 e 0,30 g, incluindo diversos açúcares livres, como a glucose (0,7% de todo o ovo, 0,8% da clara e 0,7% da gema) e glicoconjugados. A maioria dos hidratos de carbono no ovo são oligossacarídeos ligados às proteínas. Os componentes inorgânicos presentes na clara incluem enxofre, potássio, sódio e cloro. Muitos dos micronutrientes podem ser manipulados para fins dietéticos, sendo a vitamina E, o

selénio e os pigmentos os nutrientes mais pesquisados para esta finalidade (**Cherian, 2011**).

1.1.1.3.2. Composição da Casca

A composição da casca é de aproximadamente 98% de carbonato de cálcio (na forma de calcite) e 2% de matriz orgânica (**Ramanoff, 1949; Sparks, 2014**). A casca é, portanto, composta principalmente por minerais inorgânicos e componentes orgânicos da matriz. Estes componentes orgânicos são compostos por proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos, sendo os iões cálcio o principal componente inorgânico da casca de ovo (**Mine e Zhang, 2013**).

As membranas da casca são constituídas por colagénios tipo I, V e X (aproximadamente 10% da proteína da dupla membrana), glicosaminoglicanos (GAGs), proteínas da clara do ovo (como a ovotransferrina e a lisozima) e proteínas da matriz da casca de ovo (**Hincke et al., 2000; Hincke et al., 2010; Nakano et al., 2003; Nys et al., 2004**). As proteínas das membranas têm um alto teor de arginina, ácido glutâmico, metionina, histidina, cisteína e prolina (**Britton e Hale, 1977**).

1.1.2. Consumidor de ovos: atitudes, perceções e comportamento

A nível mundial, a China é o maior produtor de ovos (com aproximadamente 37% da produção mundial), apresentando um elevado crescimento nas últimas duas décadas, onde o consumo por pessoa atingiu os 333 ovos em 2008. Em segundo lugar encontra-se a União Europeia, que apresenta um consumo diversificado consoante o estado membro, com a França, a Itália e a Espanha a liderar a produção europeia. De acordo com a FAO o consumo médio de ovos na Europa manteve-se constante ao longo do tempo, aumentando apenas 0,3% entre 1997 e 2007 e estima-se que os europeus consumam 230 a 240 ovos por pessoa por ano. Os EUA, o terceiro maior produtor de ovos à escala global, nos últimos anos mostraram uma produção mais dinâmica, comparativamente com a UE (**Magdelaine, 2011**).

A falta de interesse em perceber o consumidor e as suas atitudes prende-se com o facto de o consumo de ovos se ter mantido sensivelmente constante e de vários estudos científicos salientarem os problemas alusivos à ingestão deste alimento, tal

como o elevado nível de colesterol, assim como possíveis contaminações por *Salmonella* (Magdelaine, 2011).

A secção seguinte desta dissertação identifica os principais fatores de risco e os principais benefícios inerentes ao consumo de ovo.

1.1.3. Fatores de risco inerentes ao consumo de ovo

1.1.3.1. *Salmonella*

A salmonelose é uma doença de origem alimentar que continua a representar uma séria ameaça à saúde humana, tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, pelo que se trata de um problema à escala global (Carrasco et al., 2012; Howard et al., 2012).

A infeção causada pela *Salmonella* é variável e pode ser influenciada pelo estilo de vida e pelo comportamento humano, bem como pelas mudanças na indústria, tecnologia, comércio e viagens (Carrasco et al., 2012). Esta infeção caracteriza-se por um início agudo de febre, dor abdominal, diarreia, náuseas e vómitos, após um período de incubação de 6 a 72 h (Gole et al., 2014).

A *Salmonella* (ver **Figura 4**) é uma bactéria gram-negativa e consiste numa forma não esporulada de bacilos, de dimensões aproximadas $0,7 - 1,5 \times 2 - 5 \mu\text{m}$ e pertence à família *Enterobacteriaceae* (Dunkley et al., 2009; Wan Norhana et al., 2010). Frequentemente, o habitat da *Salmonella* é o trato intestinal de animais como aves, répteis, animais de quinta, humanos e, ocasionalmente, insetos (Jay, 1995). Este organismo é capaz de crescer em variados meios de cultura e produzir colónias bem visíveis em 24 h a 37 °C. Habitualmente, esta bactéria é incapaz de



Figura 4 - Coloração falsa de microscopia eletrônica de transmissão de uma colónia de bactérias, *Salmonella enteritidis*; adaptada de Dowsett (2014).

fermentar a lactose e a sacarose, no entanto tanto a glucose como certos monossacarídeos são fermentados, com produção de gás (Jay, 1995). A *Salmonella* consegue crescer em intervalos de temperatura entre 7 e 48 °C, mas a temperatura ótima de crescimento está compreendida entre 35 e 37 °C. Relativamente ao pH, os valores

admissíveis são de 4,5 a 9,3, no entanto a taxa específica de crescimento é máxima em ambientes com valores de pH entre 6,5 e 7,5 (pH ótimo). No que se refere à atividade da água (a_w), o valor mínimo ao qual este microrganismo cresce é de 0,93 (ASAE, 2014).

A nomenclatura da *Salmonella* é complexa e baseada na denominação do serotipo (definido com base na caracterização dos antígenos O, H e Vi) e da subespécie (Dunkley et al., 2009).

Diferentes serotipos de *Salmonella* podem ser isolados dos ovos, porém a mais comum é a *Salmonella enteritidis* (Hierro et al., 2009). Na UE este serotipo é responsável por cerca de 60% de todos os surtos causados por *Salmonella*, sendo os ovos e os ovoprodutos os alimentos mais frequentemente envolvidos (Hierro et al., 2009; Howard et al., 2012; Pouillot et al., 2014). Desde o final da década de 70 que a *Salmonella enteritidis* emergiu como a maior causa de salmonelose nos EUA, na Europa e na América do Sul (Latimer et al., 2002). Os casos de salmonelose aumentaram bastante entre 1980 e 1990 e esses números apenas diminuíram após a implementação de medidas de prevenção e controlo (Botey-Saló et al., 2012; Rodrigue et al., 1990). Em 2008, apenas na UE, foram contabilizados 131.468 casos de salmonelose em humanos (Carrasco et al., 2012). No entanto, extensos casos de surtos de *Salmonella* estão associados ao consumo de produtos contaminados, como por exemplo maionese, gelados e sobremesas frias, ou seja produtos preparados com adição de ovo cru e não processados termicamente (Gole et al., 2014).

A contaminação do ovo por *Salmonella* pode ocorrer por duas vias, a vertical e a horizontal. A transmissão vertical advém da contaminação do conteúdo do ovo aquando a sua formação e antes do revestimento com a casca. A transmissão horizontal pressupõe a contaminação do conteúdo do ovo através da casca, durante a deslocação através da cloaca ou após a oviposição e a contaminação fecal da superfície externa da casca (Gole et al., 2014; Martelli e Davies, 2012). Wang e Slavik (1998) documentaram a capacidade da bactéria, proveniente da superfície da casca, penetrar e contaminar o interior do ovo através dos poros, apesar das barreiras físicas e das propriedades antimicrobianas da clara. A contaminação do conteúdo por penetração da bactéria na casca é mais provável que aconteça nos primeiros minutos após a oviposição, quando a cutícula, ainda imatura, oferece menor proteção à entrada de bactérias. Além disso, o diferencial de temperatura positivo cria uma pressão negativa, que permite a entrada de bactérias para o interior, se existir ambiente húmido na

superfície da casca. O problema é exacerbado devido a fatores como o envelhecimento das galinhas, uma vez que a qualidade da casca é reduzida, bem como problemas nutricionais ou infeções (**Martelli e Davies, 2012**).

A literatura relata que, no caso de ovos não processados, o total de população bacteriana aeróbia presente na casca é aproximadamente 4 - 5 log UFC (unidades formadoras de colónias) por ovo, dos quais 1,6 - 2,9 log UFC/ovo são de *Enterobacteriaceae* (**Hierro et al., 2009**). A lavagem dos ovos é bastante eficaz na redução de *Enterobacteriaceae* da superfície da casca. Todavia é importante ter em atenção a recontaminação dos ovos após a lavagem (**Gole et al., 2014**).

Para evitar/minimizar a contaminação microbiológica dos ovos poderá utilizar-se o tradicional cozimento/pasteurização, ou outras possibilidades, tais como o revestimento da casca de ovo com quitosano, permitindo a preservação da qualidade interna, a extensão do prazo de validade e ainda a redução da contaminação da casca de ovo, uma vez que este polissacarídeo apresenta atividade antimicrobiana contra fungos, leveduras, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (**Chousalkar et al., 2010; Leleu et al., 2011**).

O controlo da bactéria na casca de ovo requer portanto um esforço integrado de todas as etapas processuais, desde a instalação de produção de ovos até ao consumidor final (**International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2005**).

1.1.3.2. Colesterol

O colesterol desempenha um papel fulcral na estrutura das membranas celulares, atua como precursor de hormonas esteroides e ácidos biliares e é o principal esteroide sintetizado e transportado no plasma sanguíneo de todos os animais, pelo que é importante num nível adequado para uma vida saudável (**Albuquerque et al., 2014; Naviglio et al., 2012**). Do ponto de vista nutricional, não é encontrado em quantidades significativas em fontes vegetais, estando essencialmente presente em alimentos de origem animal, nomeadamente queijo, ovos, carne, peixe e camarão (**Albuquerque et al., 2014**).

O ovo é a principal fonte de colesterol dietético (encontrado nos alimentos), contendo cerca de 200 mg de colesterol (**Chagas et al., 2013; Li et al., 2013; Shi et al., 2011**). Estudos do metabolismo humano e animal determinaram que o colesterol

proveniente do ovo poderia elevar os níveis séricos da lipoproteína de baixa densidade (LDL), um estabelecido fator de risco de doenças cardiometabólicas, tais como as doenças cardiovasculares (*cardiovascular diseases* - CVD) e diabetes (Li et al., 2013; Shi et al., 2011). Porém, o ovo é simultaneamente a maior fonte de fosfolípidos e, novas investigações nesta área evidenciaram que, os fosfolípidos (como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e esfingomielina) afetam a absorção do colesterol, levando à sua supressão (Blesso, 2015; Cohn et al., 2010). Esta inibição da absorção do colesterol potencia a sua consequente diminuição no sangue e simultaneamente reduz o risco de CVDs (Blesso, 2015). Isto tem sido demonstrado de forma consistente em investigações *in vitro* e *in vivo* em animais e humanos com base em estudos pré-clínicos (Cohn et al., 2010).

Em Portugal, a ingestão média diária de colesterol varia entre os 360 e os 378 mg, para rapariga e rapaz, respetivamente. No que se refere aos adultos portugueses, a ingestão média de colesterol varia entre 302 mg/dia (mulheres) e os 324 mg/dia (homens) (Albuquerque et al., 2014).

A dieta é um complexo e irrefutável fator de risco das CVDs (Goldberg et al., 2014). Todavia devem ser considerados outros fatores como é o caso de algumas características demográficas (idade, sexo, raça e educação), tabagismo, alcoolismo e sedentarismo (Houston et al., 2011).

1.1.4. Benefícios inerentes ao consumo de ovos

Grande parte dos autores que relatam os malefícios associados à ingestão de ovos também reconhece o reverso da medalha, no sentido em que contrapõem esta abordagem negativa, reconhecendo que uma ingestão adequada deste alimento pode constituir um benefício para a saúde.

O ovo contém nutrientes benéficos, como proteínas de alto valor biológico, gorduras monoinsaturadas, minerais, ácidos gordos vitais, selénio, aminoácidos essenciais (como a arginina que desempenha um papel importante na função endotelial) e vitaminas do complexo A, B (como B₁₂, folato, colina e riboflavina), D, E, e K (Chagas et al., 2013; Domingo, 2014; Goldberg et al., 2014; Li et al., 2013; Naviglio et al., 2012; Shi et al., 2011). Enquanto os minerais são necessários para o corpo humano na manutenção de um estilo de vida saudável, a deficiência na vitamina E, B₁₂ e folato está relacionada com o aumento do risco cardiovascular (Chagas et al., 2013).

A matriz lipídica da gema serve para aumentar a biodisponibilidade de nutrientes como a luteína e a zeaxantina, antioxidantes poderosos que podem ter um efeito protetivo contra a oxidação de lipoproteínas. Por outro lado, o colesterol, num nível razoável, é benéfico para a saúde, uma vez que é um componente das membranas celulares, precursor de hormonas e essencial para a produção de ácidos biliares, sem os quais as gorduras não podem ser digeridas. Assim, é concebível, que os efeitos adversos decorrentes do conteúdo elevado de colesterol no ovo sejam contrabalançados pelos potenciais efeitos benéficos dos outros nutrientes que o constituem (**Chagas et al., 2013**).

1.1.5. Ovoprodutos

1.1.5.1. Funcionalidades e propriedades industriais relevantes

O tempo de prateleira dos alimentos é influenciado por fatores extrínsecos (condições ambientais) e fatores intrínsecos (nutrientes e a_w) (**Theron et al., 2003**). A produção industrial de ovoprodutos oferece benefícios únicos, como a extensão do prazo de validade e facilidade de transporte e o armazenamento (**Oliveira et al., 2013**). De facto, a necessidade de armazenamento e transporte do ovo levou ao aparecimento de outras formas de comercialização deste alimento e consequente extensão do prazo de validade.

O ovo é usado em muitos produtos alimentares devido às suas propriedades funcionais, das quais se salienta a coagulação, a emulsificação, a formação de espuma e adição de cor e sabor aos produtos, tornando-se um ingrediente muito difícil de substituir na formulação de uma receita (**Taylor et al., 1990; Vaclavik e Christian, 2003**).

A **Tabela 2** esquematiza algumas funções do ovo nos sistemas alimentares.

Tabela 2 - Algumas funções relevantes do ovo nos sistemas alimentares, adaptado de **Vaclavik e Christian (2003)**.

Funções	Algumas utilizações do ovo na indústria alimentar
Agente de ligação	O ovo é viscoso e coagula (para um estado sólido ou semi-sólido), por conseguinte liga ingredientes, como é o caso do rolo de carne ou de croquetes.
Agente clarificante	A clara de ovo crua coagula em torno de partículas num líquido quente.
Emulsionante	A gema de ovo contém emulsionantes fosfolipídicos, incluindo lecitina. Os emulsionantes permitem a mistura de dois líquidos imiscíveis, tais como óleo e água, na preparação de maionese.
Formação de espuma	A clara do ovo aumenta de seis a oito vezes o volume quando batida numa espuma. Estas espumas são utilizadas na confeção de merengues e sobremesas.
Gel	Um sistema de duas fases de líquidos em sólidos, levando à formação de um gel em cremes.
Agente espessante	O ovo coagula e engrossa/espessa misturas como cremes e molho holandês.
Outras	Cor, sabor, valor nutritivo, etc. Os ovos desempenham muitas outras funções nos alimentos. Por exemplo os carotenoides presentes na gema podem ser adicionados aos produtos para dar cor.

1.1.5.2. Inovação e processamentos

No seguimento das propriedades funcionais descritas anteriormente surge a sua aplicação a nível industrial, sob a forma de ovoprodutos, largamente utilizados na indústria alimentar (**Linden e Lorient, 2007**).

Os ovoprodutos, nas mais diversas formas (líquidos, congelados e desidratados), são resultantes do processamento do ovo inteiro, da gema ou da clara. Estes produtos são utilizados por exemplo na fabricação de pães, macarrão, doces, produtos de pastelaria, maionese, molhos para salada, margarina, produtos de carne e gelados (**Belitz et al., 2009**).

Estes ovoprodutos apresentam uma série de vantagens e limitações que estão descritas sumariamente na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Vantagens e limitações dos principais tipos de ovoprodutos, adaptada de **Linden e Lorient (2007)**

Tipo de ovoprodutos	Vantagens	Limitações
Ovoprodutos líquidos	<ul style="list-style-type: none"> • Propriedades funcionais semelhantes ao ovo com casca; • Grande flexibilidade; • Preparação de produtos com variação de sólidos, sal e açúcar. 	<ul style="list-style-type: none"> • Uso imediato sem conhecimento prévio dos resultados dos controlos microbiológicos.
Ovoprodutos congelados	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da viscosidade e possibilidade de retorno ao valor normal pela adição de sal e/ou açúcar; • Qualidade bacteriológica semelhante ao produto fresco, se a utilização for imediatamente após o descongelamento. 	<ul style="list-style-type: none"> • Armazenamento a -20 °C; • Inflexibilidade de utilização; • Modificação das propriedades funcionais e amostra heterogénea após descongelação.
Ovoprodutos desidratados	<ul style="list-style-type: none"> • Transporte e armazenamento económico; • Conservação do produto por mais de 1 ano a 20 °C; • Qualidade bacteriológica estável; • Aumento da viscosidade dos ovos reidratados. 	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição das propriedades funcionais; • Etapa de reidratação deve ser controlada.

Dada a enorme versatilidade do ovo, a sua aplicação nos mais diversos produtos está largamente distribuída em todo o mundo. A **Figura 5** ilustra exemplos de ovoprodutos comercializados em vários países.

**Figura 5** - Ovoprodutos comercialmente disponíveis em vários países.

Existem duas fontes de contaminação de ovoprodutos: o próprio ovo e o meio ambiente. Um momento crucial é a quebra do ovo, uma vez que pode ocorrer a contaminação por parte dos microrganismos presentes na casca. No que se refere ao meio ambiente, uma possível fonte de problemas são os equipamentos industriais, pelo que este tipo de contaminação pode ser controlado se a empresa seguir regras de higiene e de desinfecção do local bem como do material. Consequentemente, após a quebra, as principais defesas naturais do ovo diminuem rapidamente, por este motivo estes produtos à base de ovo devem passar por um tratamento térmico com a finalidade de reduzir a flora contaminante, garantir a higiene do produto e assegurar particularmente a destruição da *Salmonella* (Bourgeois et al., 1996).

1.1.6. Aplicações da casca de ovo: matéria-prima industrial

As indústrias alimentares contribuem significativamente para a poluição pelo que é imperativo procurar soluções eficazes para esta problemática. Atualmente, as restrições inerentes a questões ambientais estão cada vez mais rigorosas, o que leva à necessidade de desenvolver sistemas otimizados para o tratamento de resíduos alimentares (Oliveira et al., 2013). Na China, por exemplo, são produzidas anualmente 4 milhões de toneladas de cascas e estima-se que este valor continue a crescer no futuro (Gao e Xu, 2012). Nos EUA, 600.000 toneladas são produzidas por ano e descartadas em aterros com um custo de 40\$/tonelada, dependendo da localização do aterro (Ruff et al., 2012). De fato, as cascas de ovos resultantes destas operações de quebra são tradicionalmente tratadas como lixo, a maioria das quais são depositados em aterros sem qualquer pré-tratamento (Gao e Xu, 2012; Mijan et al., 2014).

A casca é largamente produzida na indústria de ovoprodutos, e ainda que as empresas a centrifuguem para aproveitar a clara aderida, após este processo a casca torna-se um resíduo o qual, é normalmente empilhado fora da fábrica causando poluição do ar e do solo por causa da alteração sofrida por deterioração microbiana (Ockerman e Hansen, 1994). Assim, a casca constitui um problema ambiental, especialmente em países onde esta indústria está fortemente desenvolvida (Toro et al., 2007).



Recentemente surgiram algumas tecnologias que permitem a separação eficiente da casca das respetivas membranas, tornando possível o desenvolvimento de produtos de valor acrescentado a partir de ambos os materiais (Ruff et al., 2012). Um método

descrito com esta finalidade é a flutuação diferencial de fragmentos da casca e partículas da membrana em água. Estes autores conseguiram recuperar, mediante este processo, 96% das membranas e 99% do cálcio, com 2 horas de operação (Yoo et al., 2009). Wu (1995) discutiu pela primeira vez as aplicações reais das membranas da casca de ovo. A separação completa das membranas aumenta o valor dos produtos resultantes (Glatz et al., 2011).

A Tabela 4 sumaria alguns estudos de aplicações da casca e membranas em distintas áreas de atuação.

A casca é uma fonte rica de minerais, que serve como material base usado na indústria farmacêutica, como suplemento de cálcio e aditivo alimentar, fertilizante agrícola, estabilizador do pH dos solos ou componente para implantes ósseos (Oliveira et al., 2013). Vandepopullere, Walton e Cotterill (1975) demonstraram o valor nutricional da casca com alguma clara aderida, sendo o cálcio comparável a outros recursos como o calcário, com a vantagem de possuir ainda uma pequena quantidade de proteínas e minerais. O suplemento dietético constituído pelas membranas de casca naturais (NEM- *Natural Eggshell Membrane*) contém GAGs e proteínas essenciais para a manutenção da cartilagem articular saudável. As membranas da casca são altamente porosas, têm propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias e são constituídas por uma grande quantidade de minerais e aminoácidos. Devido a estas características peculiares são amplamente usadas em terapêutica, nutracêutica, metalúrgica, biorremediação, entre outras (Guru e Dash, 2014).

Tabela 4 - Estudos e respetivas aplicações da casca de ovo e/ou membranas aderidas em diversificadas áreas.

Utilização	Resultados	Referência (s)	
Alimentar			
Suplementos de cálcio para a alimentação animal e/ou humana	Num estudo de leitões em crescimento, o pó de casca de ovo é considerado igual ou melhor fonte de cálcio comparativamente com o carbonato de cálcio purificado. Como este modelo é representativo para seres humanos, também é uma promissora fonte de cálcio para o homem.	(Schaafsma e Beelen, 1999)	
Biomédica & Farmacêutica			
	Substituto ósseo para uso em cirurgia maxilofacial	Foi demonstrada uma excelente biocompatibilidade em vários casos experimentais estudados.	(Dupoirieux et al., 1995)
	Síntese de hidroxiapatite	Este material biocerâmico é essencialmente usado na área biomédica em ortopedia, odontologia e na produção de dispositivos médicos.	(Rivera et al., 1999; Sanosh et al., 2009)
	Atenuação ou prevenção da osteoporose mediante o emprego de casca de ovo e fosfopéptidos de caseína	O co-tratamento da casca de ovo com fosfopéptidos de caseína aumenta a capacidade de absorção do cálcio pelo corpo, o que atenua a gravidade da osteoporose pós-menopausa.	(Kim et al., 2013)
Industriais			
- Extração de componentes de interesse em diversas áreas	Extração de colagénio	O colagénio das membranas da casca de ovo foi extraído com digestão ácido-pepsina. Este colagénio é nomeadamente tipo I e pode ser utilizado em alimentos funcionais e indústria cosmética, biomédica e farmacêutica	(Wong et al., 1984)
- Extração de componentes de interesse em diversas áreas	Extração de GAGs	Os resultados deste estudo sugerem que a casca de ovo tem potencial comercial como fonte de GAG e cálcio. Os GAGs foram extraídos a partir de casca de ovo descalcificada por digestão com papaína e são compostos interessantes em diversas áreas (por exemplo farmacêutica, cosmética e alimentar).	(Nakano et al., 2001)
- Indústria de materiais	Material de enchimento para os compósitos de polipropileno	As cascas de ovos podem ser facilmente utilizadas como material de enchimento para os compósitos de polipropileno, apresentando maior força comparativamente com compósitos feitos com carbonato de cálcio tradicional.	(Toro et al., 2007)
- Indústria do papel	Aplicação do carbonato de cálcio proveniente da casca de ovo como pigmentos de revestimento de papel de impressão	Aumenta a densidade ótica de ciano, magenta e amarelo (melhora o desempenho multicolor), enquanto diminui a densidade de tinta preta e do brilho do papel revestido.	(Yoo et al., 2009)

Dado o interesse crescente em novas formas de valorização da casca de ovo, diversos processos têm sido patenteados. Em Portugal, mais concretamente na Universidade de Aveiro, foi submetido recentemente um pedido de patente, que até à data ainda não foi concedido, para a incorporação deste resíduo numa pasta cerâmica. O principal objetivo desta invenção é a aplicação industrial da casca de ovo, evitando todos os problemas ambientais de deposição em aterro sanitário, bem como o aumento do campo de aplicação, permitindo a substituição da calcite por um material de baixo custo (UATEC, 2014).

A **Tabela 5** ilustra processos patenteados para a separação das membranas da casca e de patentes que possibilitam a utilização desta e das membranas separadamente.

Tabela 5 - Processos patenteados de separação das membranas aderidas à casca, bem como utilização do invólucro ou das membranas separadamente.

Número/ Data	País	Inventor (es)	Descrição	Referência (s)
Separação das membranas aderidas à casca de ovo				
US6176376 B1 23 Jan 2001	EUA	Joseph H. MacNeil	Desgaste das partículas da casca, de forma a quebrar a ligação entre as membranas e a casca. De seguida são transportados para um tanque com água e é gerada turbulência. As membranas ficam retidas no líquido enquanto as cascas ficam depositadas no fundo do tanque. Ambas seguem uma etapa de desidratação.	(MacNeil, 2001)
CA2797232 A1 17 Nov 2011	Canadá	Levi New	Sistema mediante o qual a geração de fluxo de ar permite pulverizar a casca de ovo e desta forma separar as membranas da casca.	(New, 2011)
Casca				
WO1996015678 A1 30 May 1996	Mundial	Cornelis Glas, Anne Schaafsma	Enriquecimento de produtos lácteos com pó de casca de ovo (devidamente esterilizado). Este enriquecimento com cálcio permite maior absorção e retenção de cálcio.	(Glas e Schaafsma, 1996)
CA2730664 A1 14 Jan 2010	Canadá	Ilan Elias	Extração de polipeptídeos da casca de ovo para o crescimento de células de formação óssea (osteoblastos). Estimulação da atividade osteogénica e osteoindutora.	(Elias, 2010)
CN103739324 A 23 Apr 2014	China	Xia Zhi	Fertilizante para cultivo de flores constituído por pó de casca de ovo. Misturam-se as matérias-primas a 10-20 °C durante 10-15 dias ou 21-30 °C durante 5-7 dias. Este fertilizante é diluído em água.	(Zhi, 2014)
Membranas				
US20080014282 17 Jan 2008	EUA	Frank Long, Randall Adams, Dale DeVore, Marshall Franklin	Hidrólise enzimática das membranas da casca. O hidrolisado das membranas da casca é rico em componentes naturais como hexosamina, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, colagénio e outras proteínas. Relevante na área terapêutica, nutracêutica e cosmética.	(Long, 2008)
US7767297 B2 3 Aug 2010	EUA	Takeharu Tajima, Nobuo Kusamoto	Produção de nanofibras pelo método <i>electrospinning</i> . Estas fibras têm o mesmo comportamento que a casca de ovo natural, pelo que é uma estrutura permeável ao ar e também aderem à pele. Aplicações como adesivos/tratamento de feridas.	(Tajima e Kusamoto, 2010)

.....

Como foi dito anteriormente, a necessidade de desenvolver uma solução viável para a utilização e valorização da casca de ovo tem proporcionado a integração de metodologias, que visam valorizar os componentes da casca, para o desenvolvimento de produtos de valor acrescentado. No entanto, não têm sido encontradas soluções que satisfaçam os interesses económicos e ambientais.

A globalização tem favorecido a permuta de conhecimento, pelo que é necessário estudar e avaliar novas formas de utilização e valorização da casca por parte dos países onde a indústria de ovoprodutos se encontra fortemente desenvolvida.

As **Tabelas 6 e 7** mostram as estratégias seguidas pelos principais produtores de ovoprodutos e a legislação aplicada nesses países integrantes ou não da Comunidade Europeia (CE).

Tabela 6 - Legislação e estratégias seguidas por alguns dos principais países produtores de ovoprodutos da CE.

Legislação	Estratégias de atuação	Referência (s)
Portugal		
Segue o Regulamento (CE) nº 1069/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de Outubro de 2009.	O tratamento habitual dado pelas empresas de ovoprodutos passa pela recolha e deposição em aterro. Contudo novos estudos desenvolvidos na Universidade de Coimbra (transformação das cascas num novo aditivo que pode ser utilizado para correção de solos) e na Universidade do Minho (descoberta de uma forma ecológica para tratar resíduos líquidos das indústrias) podem vir a mudar o panorama nacional. Outra possível utilização para a casca de ovo é como corretivo alcalinizante.	(Universidade de Coimbra, 2012; Magalhães et al., 2011; Ribeiro, 2014)
Espanha		
Segue o Regulamento (CE) nº 1069/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de Outubro de 2009.	A estratégia até agora adotada pelas empresas espanholas passa por pagar a uma empresa de recolha que se encarregará da sua entrega para incineração das mesmas. Um suplemento de cálcio, produzido a partir das membranas da casca de ovo, para animais de estimação está disponível comercialmente. Um novo método para obter lactulose foi desenvolvido por um grupo de investigadores em 2004. A lactulose que é um dissacarídeo sintético com efeito laxante, utilizado como suplemento nas rações animais e no tratamento de encefalopatias humanas.	(Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2004)
França		
Segue o Regulamento (CE) nº 1069/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de Outubro de 2009.	Uso da casca como material de construção, alimentação animal, compostagem e digestão anaeróbia são algumas possibilidades exploradas em França.	(SNEA e FNSEA, 2009; Wilcox, 2014)
Itália		
Segue o Regulamento (CE) nº 1069/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de Outubro de 2009.	Uma das estratégias adotadas pelas empresas consiste na trituração e secagem rápida da casca para logo serem aproveitados pelas empresas de produção de ração para animais, pois permite a ingestão de cálcio proveniente de uma fonte natural, bem como de importante conteúdo proteico.	(Universidade de Huelva, 2009)
Reino Unido		
Segue o Regulamento (CE) nº 1069/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de Outubro de 2009. No entanto tem a particularidade de seguir regulamentação própria para países integrantes do Reino Unido (2011). Segundo esta regulamentação/legislação nacional o Reino Unido permite que a casca seja depositada em aterro sem prévio tratamento térmico.	Estudos realizados na Universidade de Leicester, Reino Unido, sugerem a reutilização da casca para a produção de embalagens biodegradáveis/ bioplásticos para produtos alimentares e comprimidos. Por outro lado, outra possível utilização que o Reino Unido tem seguido para as cascas passa pela produção de um suplemento alimentar para adultos a fim de combater doenças como a osteoporose e outros problemas relacionados com os ossos.	(Brewer, 2013; CNN, 2013; DEFRA, 2011)

Tabela 7 - Legislação e estratégias seguidas por alguns dos principais países produtores de ovoprodutos não constituintes da CE.

Legislação	Estratégias de atuação	Referência (s)
Argentina		
O tratamento da casca baseia-se no documento ENGIRSU (Estratégia Nacional de Gestão Integrada de Resíduos Sólidos) de 2006 proposto pelo ministério do ambiente deste país.	A maioria das empresas da Argentina segue uma lógica semelhante dos países europeus para o tratamento das cascas, ou seja a recolha e incineração das mesmas. No entanto, novos estudos têm motivado o reaproveitamento da casca para produção de tinta acrílica para as casas e infra-estruturas, assim como para o tratamento de solos.	(Cronista, 2014; Secretaría de Ambiente y Desarrollo, 2005)
Colômbia		
Segue o regulamento presente no decreto de lei 1713 de 2002, 1140 e 1505 de 2003 para o tratamento dos resíduos sólidos.	O tratamento das cascas por parte da Colômbia passa pela recolha e incineração das mesmas. Por outro lado, novos estudos utilizam a casca para descontaminação dos rios, mediante absorção de metais pesados (como o zinco, mercúrio etc).	(Cataño, 2013; Gallego, 2013)
Brasil		
O Brasil segue o regulamento presente no decreto de lei nº 7404 e nas leis nº 12305, nº 11.445, Lei nº 11.107 e 9765 que institui a política seguida para o tratamento dos resíduos sólidos.	A maioria das empresas opta pela recolha e envio para incineração da casca. Contudo alguns estudos realizados nas universidades do Brasil mostram possíveis soluções para o reaproveitamento da casca, tais como, a produção de biodiesel.	(Araujo, 2013)
EUA		
A entidade reguladora das regulamentações utilizadas nos Estados Unidos é a EPA (Agência de Proteção Ambiental) que definiu as regras para o tratamento de resíduos sólidos nas seguintes leis RCRA (Conservação dos Recursos e Ato de Recuperação) 1976 e 2001 e CERCLA (Lei Integral da Resposta, Compensação e Responsabilidade Ambiental) 1980.	O tratamento dado pelas empresas para os resíduos sólidos provenientes da casca passa pela recolha e incineração da mesma. Existindo ainda algumas que enviam a mesma para aterros. Algumas das aplicações encontradas nos estudos desenvolvidos nos Estados Unidos passa por reaproveitar para a produção de colagénio e a captura de dióxido de carbono a fim de produzir hidrogénio, favorecendo os estudos e o desenvolvimento de carros movidos a hidrogénio.	(Tecnológica, 2007; US EPA & Office of Resource Conservation and Recovery, 2013)

1.2. Entidade de Acolhimento do estágio

O GRUPO DEROVO (ver logótipo na **Figura 6**) é líder ibérico na produção e comercialização de ovoprodutos e aposta fortemente na investigação e desenvolvimento de novos produtos alimentares (**Derovo Group, 2014**). Este grupo empresarial reúne empresas ligadas sobretudo à indústria avícola e à comercialização dos seus produtos (DDO - DERIVADOS DE OVOS LDA, DEROVO - DERIVADOS DE OVOS S.A., DEROVO II, GEMADOURO, DEROVO SGPS, INOGEN, OVOFOODS S.A. e DOUTEC - D'OU I TECNOLOGIA S.L.) (**Derovo Group, 2010**).



Figura 6 - Logótipo do GRUPO DEROVO.

O GRUPO DEROVO viu no ovo uma fonte de inspiração, um recurso versátil e com enorme potencial, pelo que recriou e processou o ovo permitindo a sua chegada ao mercado nas mais diversificadas formas (**Derovo Group, 2013**). Aliado a tudo isto, esta entidade trabalha com a finalidade de melhorar constantemente, e desenvolver de forma sustentável, a sua atividade e organização, levando ao reconhecimento dos mercados onde atua (**Derovo Group, 2014**).

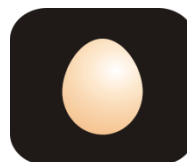
1.2.1. Identidade e contextualização sociocultural

Os parâmetros identificativos do organismo de acolhimento deste estágio curricular estão listados na **Tabela 8**.

A DEROVO nasceu de um projeto idealizado e promovido, no ano de 1994, reunindo a vontade de 71 avicultores de todo o país, representando na altura mais de 70% da produção nacional de ovos para consumo (**Caldeira, 2011; Derovo Group, 2010, 2014**). O principal intuito na génese desta empresa foi a criação de uma indústria de ovoprodutos, constantemente focada no desenvolvimento e inovação (**Caldeira, 2011**).

Tabela 8 - Parâmetros identificativos da entidade de acolhimento do estágio: DEROVO - DERIVADOS DE OVOS S.A., adaptado de Agência Portuguesa do Ambiente (2011) e de Deroovo Group (2010, 2014).

DEROVO - DERIVADOS DE OVOS S.A.	
Morada	Parque Industrial Manuel da Mota, n° 30 Apartado 1018 3100-354 Pombal, Portugal
Atividade Comercial	Tratamento e transformação de matérias-primas animais destinadas ao fabrico de produtos para a alimentação humana (fabrico de ovoprodutos).
Número de Identificação de Pessoa Coletiva (NIPC)	503 257 052
Telefone	236 209 820
FAX	236 209 825
E-mail	geral@derovo.com
Webpage	http://www.deroovo.com/



A DEROVO apresenta-se no mercado com indicadores de excelência e com 2 décadas de uma história repleta de sucessos, como se pode ver pelos diferentes prémios e distinções (**Figura 7**).

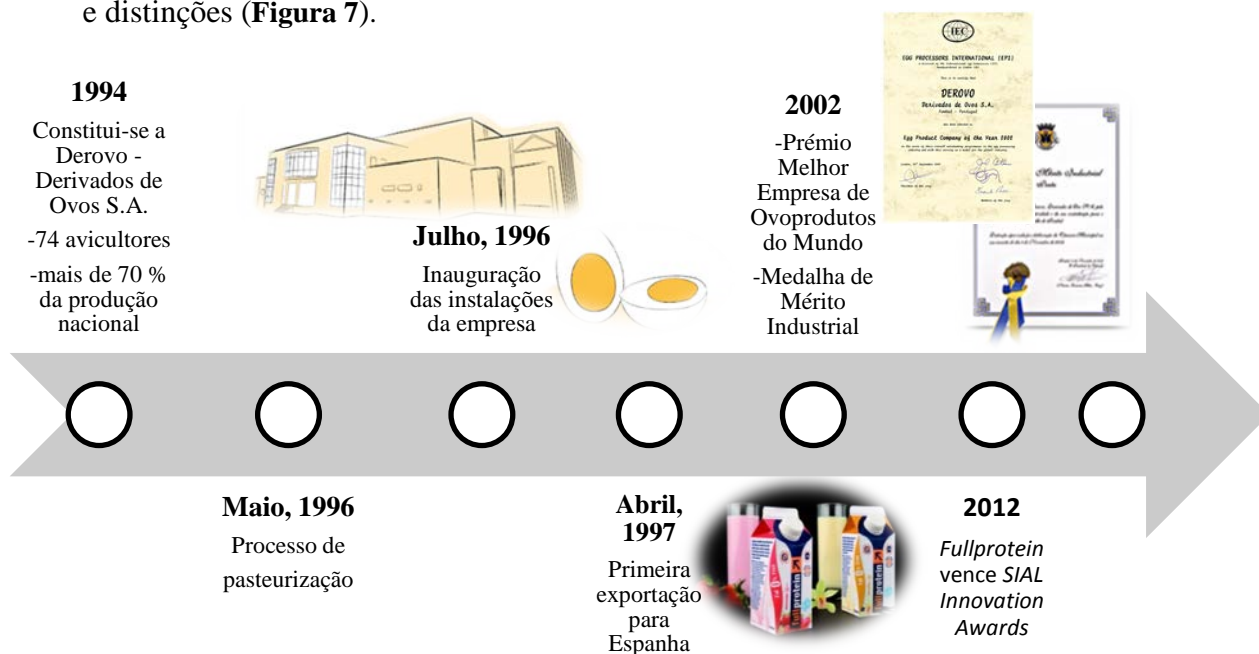


Figura 7 - Marcos determinantes para a empresa, adaptado de Deroovo Group (2010, 2014).

Inaugurada em 1996, a DEROVO, com sede em Pombal, tornou-se a primeira e única unidade de produção de ovo líquido pasteurizado no nosso país (**inCentea, 2005**).

A empresa conquistou rapidamente a confiança da indústria alimentar e iniciou a exportação para Espanha em 1997 (**Derovo Group, 2014**). Dois anos após a sua entrada no mercado, esgotou a sua capacidade produtiva de aproximadamente 70.000 kg/semana. No último trimestre de 1998 foi instalada a 2ª linha de pasteurização, aumentando a capacidade produtiva para 200.000 kg/semana (**Derovo Group, 2010**).

Em 2002, alcançou um significativo reconhecimento, ao receber o prémio de Melhor Empresa de Ovoprodutos do Mundo, o que impulsionou a empresa e aumentou as expectativas do mercado (**Derovo Group, 2014**). Simultaneamente foi também distinguida pela Câmara Municipal de Pombal com a medalha de Mérito Industrial. Ainda em 2002 foi instalada a 3ª linha de pasteurização e a unidade de produção de ovos cozidos (**Derovo Group, 2010**). Aliado a este crescimento, a forte aposta na Inovação & Desenvolvimento, permitiu a esta pequena e média empresa a chegada ao mercado com novas formas de comercialização do ovo, como foi o caso do ovo em *spray*, o ovo cozido e o *fullprotein* (**Derovo Group, 2014**).

1.2.2. Gama de produtos

O GRUPO DEROVO concebe novas soluções e conceitos alimentares, possuindo a capacidade de desenvolver e adaptar os produtos às necessidades dos clientes, apresentando uma gama de produtos diversificada (ver **Anexo A**) e dirigida a vários mercados tais como indústrias alimentares, produtos de pastelaria e padaria, confeitaria e canal Horeca (**COTEC Portugal, 2008**).

A fábrica de Pombal tem a capacidade de processar aproximadamente 1,8 milhões de ovos diariamente, produzindo ovo líquido, ovo cozido e *fullprotein* (**Derovo Group, 2014**).

1.2.3. Descrição do processo produtivo na DEROVO-Derivados de ovos S.A

A unidade produtiva situada em Pombal dedica-se essencialmente à produção de ovoprodutos líquidos e de ovo cozido. Inicialmente os ovos são devidamente inspecionados e avaliados; segue-se a quebra dos ovos por equipamentos especializados para o efeito; depois as cascas são separadas da gema e da clara e são transportadas para

a trituradora e por fim depositadas num contentor adequado. O conteúdo comestível (gema e clara) é arrefecido, filtrado e armazenado em depósitos intermédios refrigerados de produto cru; segue-se a etapa de pasteurização em contínuo e do enchimento dos produtos, em embalagens que variam entre 0,25 e 1000 kg (**Agência Portuguesa do Ambiente, 2011**).

Relativamente ao processamento do ovo cozido, após receção do ovo com casca e calibração por peso, dá-se o transporte até à cozedora de vapor, com recurso a um sistema em contínuo. Depois da etapa de cozedura dá-se o arrefecimento progressivo e transporte até à descascadora. O descasque mecânico ocorre através de um equipamento adequado, que permite a separação do ovo cozido da casca. A casca é transportada por via pneumática até ao respetivo contentor e os ovos são devidamente inspecionados e selecionados, seguindo para a contadora onde são depositados em baldes de diversas dimensões, com adição de salmoura para conservação do produto (**Agência Portuguesa do Ambiente, 2011**).

Os fluxogramas (com as entradas e saídas processuais) referentes ao processamento de ovoprodutos líquidos e ao ovo cozido encontram-se, respetivamente, nos **Anexos B e C**.

II. CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA &

OBJECTIVOS

Este estágio curricular foi desenvolvido em cooperação com o GRUPO DEROVO, mais precisamente na DEROVO – DERIVADOS DE OVOS S.A., unidade produtiva sediada em Pombal, onde diariamente são geradas aproximadamente 10 toneladas de casca de ovo, resultantes do processamento de ovoprodutos. A geração de grandes quantidades de casca constitui um elevado encargo mensal para a empresa, sendo de elevada importância o estudo do seu tratamento e valorização, de forma a tentar minimizar os custos e as consequências a nível ambiental.

Atualmente a casca de ovo (invólucro e membranas) é triturada e depositada em contentores adequados, até ao devido transporte para dois aterros.

O trabalho envolveu:

- ✓ O estudo de novas formas de utilização da casca de ovo em Portugal, Comunidade Europeia e países onde a indústria de ovoprodutos está fortemente desenvolvida (por análise de artigos científicos, processos patenteados, legislação, contacto de determinadas entidades etc.);
- ✓ A caracterização microbiológica da casca de ovo: determinação de *Escherichia coli*, coliformes totais, enterobactérias totais, *Staphylococcus aureus*, mesófilos totais, bolores e leveduras, e enterococcus;
- ✓ A deteção de presença/ausência de *Salmonella* e *Listeria* em 25 g de amostra;
- ✓ A análise do parâmetro físico-químico: humidade da casca;
- ✓ Determinação de alguns parâmetros da composição da casca de ovo (análises externas);
- ✓ A elaboração de uma proposta à organização e trabalho a desenvolver futuramente, para valorização da casca de ovo.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Substâncias químicas

A gelose chromID™ Coli (COLI ID-F), a gelose de glucose com cristal violeta, vermelho neutro e bÍlis (VRBG-F), a gelose baird parker com fibrinogênio de plasma de coelho (BP RPF), o caldo Triptona sal (TS), o caldo SX2, o caldo FRASER-1/2-MNB e o caldo FRASER-T foram adquiridos da bioMérieux (Lyon, França). O agar padrão para contagem (PCA) e a água peptonada (BPW) foram comprados à Biokar (Allonnes, França). O agar rosa de bengala com cloramfenicol (RBCA) foi adquirido da Oxoid (Southampton, Reino Unido) e o agar seletivo para enterococcus da Merck (Darmstadt, Alemanha).

3.2. Recolha e preparação de amostras

3.2.1. Casca triturada

A amostra, no caso casca de ovo triturada, foi recolhida a diferentes horas do dia (aproximadamente às 09:50 h e às 14:50 h). Para tal, foi utilizado material devidamente esterilizado. Este processo de colheita foi efetuado logo a seguir à sua trituração e antes da passagem da casca para o transportador de hélice sem-fim, através do qual a casca seria conduzida para o depósito adequado (**Figura 8**).



Figura 8 - Trituradora / centrífuga (Coenraadts Machinefabriek B.V.®, Zaandam, Holanda).

3.2.2. Casca esterilizada

Uma fração das amostras recolhidas junto da trituradora foi colocada num frasco de *schott* de 250 ml e esterilizada em autoclave a 133 °C durante 15 minutos (ver **Figura 9**). A utilização desta temperatura prende-se com o facto de ser a usada

no processo (Método 1) pela FERREIRA AVES LDA., uma pequena unidade de tratamento/processamento.

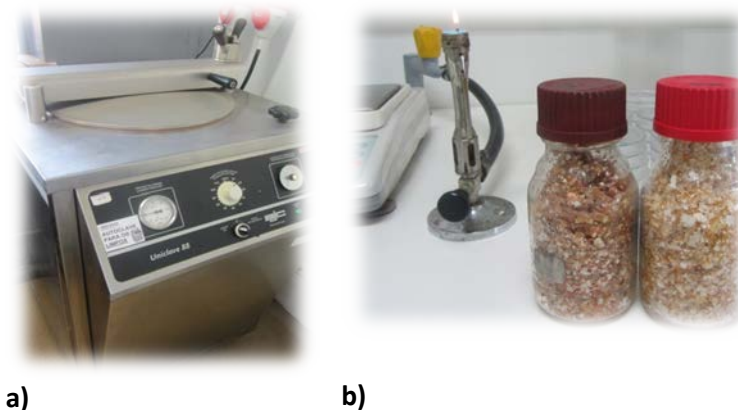


Figura 9 - Processo de esterilização, ilustrando **a)** a autoclave (UNICLAVE88®, Cacém, Portugal) **b)** as amostras de casca após esterilização.

3.3. Análises microbianas

3.3.1. Preparação da amostra e diluição

Para a caracterização microbiológica a amostra foi preparada, nas devidas condições de assepsia, numa solução *stock*. Desta forma, pesaram-se $10,00 \pm 0,01$ g da casca triturada ou esterilizada e adicionaram-se $90,00 \pm 0,01$ g de BPW num saco Stomacher®. Seguidamente efetuou-se a homogeneização a 200 rpm (rotações por minuto) durante 30 segundos, através da utilização do homogeneizador (Stomacher®400 Circulator, Brighton, Reino Unido). A partir da diluição 10^{-1} , diluições sucessivas foram preparadas em TS. Duplicados de cada diluição foram colocados em placas de Petri em meios de cultura apropriados. Todas as amostras foram analisadas para a determinação das cargas microbianas de *Escherichia coli*, coliformes, enterobactérias totais, *Staphylococcus aureus*, mesófilos totais, bolores e leveduras, e enterococcus.

3.3.2. Preparação dos meios de cultura e de BPW

Os meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. No **Anexo D** descreve-se com detalhe a preparação de cada um dos meios de cultura e de BPW, um diluente destinado à preparação de suspensões *stock*.

3.3.3. Contagem de *Escherichia coli* e restantes coliformes

Após a realização de sucessivas diluições da suspensão-mãe, efetuou-se a sementeira por incorporação ou sementeira em profundidade em meio COLI ID-F. Para tal, previamente dissolveu-se o meio em banho-maria. Depois colocou-se 1,0 ml da suspensão-mãe e de cada uma das diluições decimais em placa de Petri estéril e adicionou-se o respetivo meio à placa, com o cuidado de homogeneizar bem e sem levantar a placa. Após a solidificação sobre a bancada, as placas de Petri foram incubadas, com a tampa voltada para baixo, numa estufa bacteriológica a $37,0 \pm 0,1$ °C durante 24 ± 2 h. Após o término da incubação, selecionou-se a melhor diluição, entre 15 a 150 colónias características e menos de 300 colónias no total (características e não características), segundo a NP 2079. Posteriormente, estimou-se o teor de UFC/g a partir da média da contagem nas réplicas da melhor diluição, com a respetiva correção do fator de diluição, e os resultados foram expressos em Log_{10} UFC/g. Este procedimento possibilitou a contagem simultânea de *Escherichia coli* β -D-glucuronidase positivas e outros coliformes a 37 °C. A *Escherichia coli* β -D-glucuronidase positiva originou colónias de 0,5 a 2,0 mm de diâmetro de coloração rosa/violeta, enquanto os restantes coliformes originaram colónias de 0,5 a 2,0 mm de diâmetro de coloração azul/azul acinzentado.

3.3.4. Contagem de enterobactérias totais

Primeiramente, efetuou-se a sementeira por incorporação ou sementeira em profundidade em meio VRBG-F, pelo que se colocou 1,0 ml da suspensão-mãe e das sucessivas diluições em placa de Petri estéril e distribuíram-se aproximadamente 15,0 ml de gelose VRBG (mantida a $48,0 \pm 0,4$ °C) e misturou-se cuidadosamente. De

seguida deixaram-se arrefecer as placas, numa superfície fresca e plana, até o meio solidificar. As placas foram incubadas numa estufa, com a tampa voltada para baixo, durante 24 ± 2 h a $37,0 \pm 0,1$ °C. Após incubação desenvolveram-se colónias em profundidade e à superfície. As colónias de enterobactérias que se desenvolveram em profundidade tinham um diâmetro de cerca de 0,5 mm, com coloração rosa/ vermelha e eram rodeadas, ou não, por um halo de precipitado avermelhado. As colónias de enterobactérias que se formaram à superfície eram redondas, com um diâmetro de 1,0 a 2,0 mm, com coloração vermelha escura e com ou sem halo de precipitado vermelho escuro. Finalmente, selecionou-se a melhor diluição e estimou-se o teor de UFC/g. Os resultados foram expressos em Log_{10} UFC/g.

3.3.5. Contagem de *Staphylococcus aureus*

A sementeira por incorporação foi efetuada após a execução de sucessivas diluições decimais. Da solução-mãe e das respetivas diluições foi transferido 1,0 ml para a placa de Petri estéril. Seguidamente distribuiu-se BP RPF, que se encontrava a $48,0 \pm 0,4$ °C, homogeneizou-se cuidadosamente a placa e deixou-se solidificar o meio. As placas foram incubadas, com a tampa voltada para baixo, a $37,0 \pm 0,1$ °C. A contagem de *Staphylococcus aureus* decorreu após 24 ± 2 h e após 48 ± 2 h de incubação, como descrito na ISO 6888-2:1999. As colónias de *Staphylococcus* coagulase positivas surgiram rodeadas por um halo opaco e tinham geralmente coloração cinzenta escura. O teor de UFC/g foi estimado, mediante a seleção da melhor diluição para fazer a contagem, e os resultados expressos em Log_{10} UFC/g.

3.3.6. Contagem de mesófilos totais

Após a realização das diluições decimais, pipetou-se 1,0 ml da solução-mãe e de cada diluição, respetivamente, para uma placa de Petri esterilizada. A cada placa foi adicionado meio PCA e procedeu-se à sua homogeneização. As placas permaneceram numa bancada plana até ocorrer a solidificação no meio de cultura. As placas foram incubadas a $30,0 \pm 0,1$ °C, com a tampa voltada para baixo. Decorridas 48 ± 2 h após incubação, efetuou-se a contagem de colónias na diluição mais apropriada (apenas

foram contabilizadas placas de Petri com 10 a 300 colónias) e estimou-se o teor de UFC/g expressando os resultados em Log_{10} UFC/g.

3.3.7. Contagem de bolores e leveduras

Com o intuito de determinar os bolores e leveduras, foi efetuada a técnica de sementeira à superfície, imediatamente a seguir à realização das sucessivas diluições decimais. Para tal, colocou-se 0,1 ml da suspensão-mãe e da diluição efetuada numa placa de Petri que continha RBCA solidificado e espalhou-se uniformemente a amostra à superfície do meio com o auxílio de semeadores em forma de L descartáveis. Por fim, as placas foram incubadas durante 48 ± 2 h a $30,0 \pm 0,1$ °C. A contagem foi efetuada na diluição mais adequada, estimou-se o teor de UFC/g e os resultados expressos em Log_{10} UFC/g.

3.3.8. Contagem de enterococcus totais

Para a contagem de enterococcus totais e, após a realização das diluições decimais apropriadas, procedeu-se à realização de sementeira à superfície. Desta forma, colocou-se 0,1 ml da suspensão-mãe e da correspondente diluição para uma placa de Petri já com o meio solidificado, neste caso com agar seletivo para enterococcus. Seguidamente, mediante a utilização de semeadores em forma de L descartáveis, a amostra foi uniformemente espalhada à superfície. Por último, procedeu-se à incubação das placas a $37,0 \pm 0,1$ °C durante 48 ± 2 h. As colónias originadas, de coloração violeta, foram contadas na diluição mais adequada e os resultados foram expressos em Log_{10} UFC/g.

3.4. Detecção de *Salmonella* e *Listeria*

A deteção de *Salmonella* e *Listeria* em 25 g de amostra foi efetuada através do equipamento mini VIDAS® (ver **Figura 10**). Este teste imunoenzimático permite a deteção de antígenos de *Salmonella* e de *Listeria* pela técnica ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*). Nesta análise qualitativa automatizada os resultados foram comparados com referências internas e cada resultado foi interpretado (positivo/negativo).

O princípio de funcionamento do método, como foi efectuada a calibração-recalibração do aparelho e os procedimentos experimentais para a deteção de *Salmonella* e *Listeria* encontram-se respetivamente nos **Anexo E**, **F** e **G**.

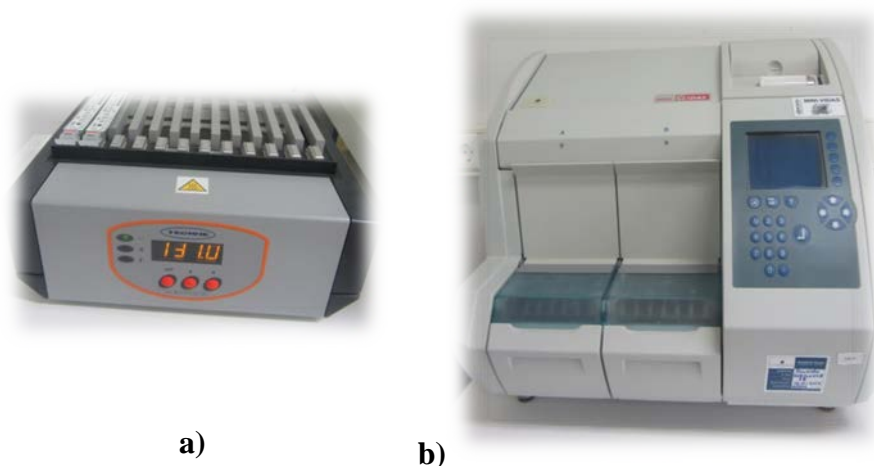


Figura 10 - Ilustração de equipamento **a)** VIDAS®Heat and Go (bioMérieux®, Lyon, França): um sistema de aquecimento a seco, concebido para aquecer 12 barretes simultaneamente; **b)** mini VIDAS® (bioMérieux®, Lyon, França), uma versão compactada do sistema VIDAS®, com computador, teclado e impressora incorporados e dois compartimentos independentes (A e B), cada um permitindo 6 testes, pelo que possibilita uma análise em simultâneo de 12 barretes.

Após a deteção de *Salmonella*, o caldo SX2 foi conservado entre 2 e 8 °C para uma eventual confirmação dos resultados positivos. Esta confirmação é possível devido às propriedades bioquímicas e serológicas e foi efectuada, através do método ISO 6579:2002 pela EMPRESA SUBCONTRATADA A. A amostra analisada foi recolhida a 25/02/2015 às 09:50h.

Após a deteção de *Listeria*, o caldo não aquecido foi conservado entre 2 e 8 °C para uma eventual confirmação dos resultados positivos. A confirmação, pela deteção da atividade da β -glucosidase, foi efetuada através de isolamento seletivo em meio

cromogénico (Gelose ALOA®) pela EMPRESA SUBCONTRATADA A. Para o efeito, foram analisadas, pelo método ALOA – AFNOR AES 10/03 – 09/00, as amostras de 18/02/2015 recolhidas às 09:50 h e 14:50 h.

3.5. Análises físico-químicas

3.5.1. Humidade da casca

Para a determinação da humidade das amostras foi utilizado o analisador de humidade avançado © Mettler-Toledo HB43-S Halogen (ver **Figura 11**). Este equipamento trabalha de acordo com o princípio de termogravimetria que consiste na medição da massa inicial da amostra, através do rápido aquecimento desta com a unidade de secagem por halogéneo integrada e consequente evaporação da água (**Mettler Toledo, 2007**).



Figura 11 - Analisador de humidade avançado (Mettler-Toledo HB43-S Halogen, Barcelona, Espanha).

Inicialmente, devido às características da casca, foi selecionado o método B (utilizado para amostras sólidas). A unidade de secagem foi aberta e colocou-se corretamente a célula de medição descartável (prato de alumínio) e, após taragem adequada, a amostra foi uniformemente distribuída no prato de alumínio (com auxílio de uma espátula), até o peso estar compreendido entre 4,3 - 5,8 g. Por fim, após o fecho da unidade de secagem, o equipamento iniciou automaticamente a secagem e medição. O processo de medição foi acompanhado no visor. A temperatura máxima atingida durante a secagem foi de 125 °C. Após sensivelmente 10 minutos, a medição foi efetuada.

3.6. Análise de parâmetros da composição da casca

A determinação de vários parâmetros constituintes da casca foi efetuada pela EMPRESA SUBCONTRATADA B. Para tal, uma amostra de casca triturada foi devidamente acondicionada e transportada para a empresa. Os parâmetros estudados e os respetivos métodos estão descritos na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Análises externas de parâmetros da composição da casca de ovo e métodos de análise.

Parâmetro	Método
Carbonato de cálcio (CaCO_3)	Cálculos
Cálcio (Ca)	Volumetria (ME-211)
Fósforo total	ME- 181
Carbonato de magnésio (MgCO_3)	Cálculos
Azoto total (N)	ME-515 (LECO)
Cinza total	ME-195
Zinco (Zn)	Absorção atómica (ME-93)
Magnésio (Mg)	Absorção atómica (ME-93)
Cobre (Cu)	Absorção atómica (ME-93)
Potássio (K)	Absorção atómica (ME-94)
Ferro (Fe)	Absorção atómica (ME-93)
Estrôncio	ICP-MS
Vitamina D2	HPLC
Vitamina D3	HPLC
Colagénio	NP 1987 (ME-499)
Manganês (Mn)	Absorção atómica (ME-485)
Sódio (Na)	Absorção atómica (ME-94)

IV. APRESENTAÇÃO DE UMA
PROPOSTA À ENTIDADE DE ACOLHIMENTO
CASO DE ESTUDO

Como descrito na secção **I. Introdução**, várias propostas têm sido discutidas a fim de reutilizar o elevado número de cascas resultantes da produção de ovoprodutos. Dos diversos estudos desenvolvidos até à data, com o intuito de encontrar uma solução viável para esta problemática, os mais evidenciados são: (1) a casca como estabilizador do pH dos solos, (2) extração de componentes das membranas para aplicações em várias áreas, (3) suplementos de cálcio, e (4) utilização em ração animal.

A casca é uma fonte interessante de cálcio e altamente disponível. **Schaafsma e Beelen (1999)** reportaram que, em estudos de leitões em crescimento, o pó de casca é, em dietas à base de caseína, uma fonte de cálcio comparável ao CaCO_3 . Já para dietas baseadas em proteína de soja, a casca é uma melhor fonte de cálcio.

O CaCO_3 é amplamente utilizado uma vez que é constituído por cerca de 40% de cálcio absorvível. As fontes naturais de cálcio, como a casca de ovo, têm um interesse acrescido uma vez que contêm outros elementos (como o estrôncio e flúor) que podem ter um efeito positivo no metabolismo ósseo. O teor baixo de chumbo, alumínio, cádmio e mercúrio, elementos potencialmente tóxicos, pode ser uma mais-valia no emprego de casca em relação a outras fontes de cálcio naturais (**Schaafsma et al., 2000**). De facto, a casca resultante de operações de quebra, é uma fonte de cálcio comparável ao calcário e à concha de ostra, com a vantagem de conter uma pequena quantidade mineral e proteica (**Scheideler, 1998**).

No decorrer deste estudo, optou-se pela incorporação de casca de ovo em ração animal, por se considerar uma das melhores maneiras para rentabilizar este resíduo da indústria alimentar e pela relativa proximidade e aceitação das empresas envolvidas (FERREIRA AVES e OVARGADO). A **Figura 12** ilustra de forma genérica as diversas etapas a fim de possibilitar a valorização da casca.

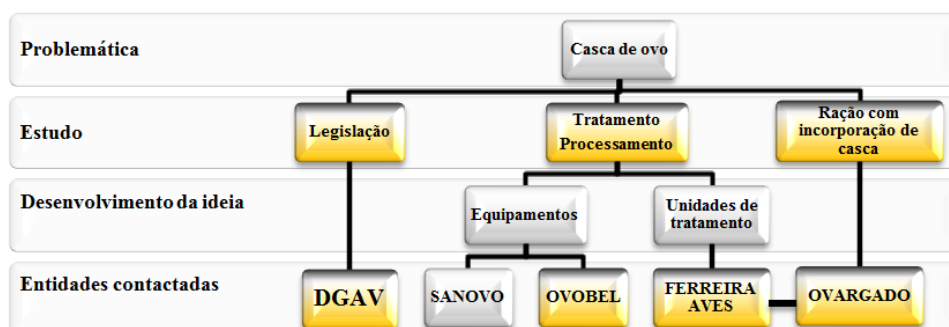


Figura 12 - Fluxograma representativo das etapas inerentes ao desenvolvimento da proposta.

4.1. Legislação

No âmbito legislativo, contactou-se a DIREÇÃO GERAL DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA (DGAV) a fim de conhecer as implicações legais. Esta entidade autoriza a utilização de matérias-primas de origem animal (ovos e ovoprodutos) em alimentação animal (ver **Anexo H**).

Numa primeira fase, pensou-se que a incorporação de casca poderia ser efetuada em alimentação de galinhas poedeiras, dada a enorme importância do cálcio na formação do próprio ovo e da casca (Nys e Guyot, 2011; Pavlovski et al., 2012). Contudo, devido a limitações logísticas, legislativas e questões éticas associadas, não foi possível. De facto, as membranas aderidas à casca são constituídas maioritariamente por proteína, pelo que seria controverso a utilização de proteína de galinha na sua própria alimentação, para posterior consumo humano.

Assim sendo, optou-se pela alternativa de fortificação da alimentação de animais de companhia com cálcio. Esta possibilidade apresenta maior viabilidade uma vez que, os animais de estimação não são consumidos pelo ser humano, tendo sido esta possibilidade resultado do contacto com as empresas (FERREIRA AVES e OVARGADO).

4.2. Processamento da casca de ovo

Numa fase inicial e antecedente ao desenvolvimento da ração com incorporação de casca, foi essencial procurar formas de esterilização/descontaminação das cascas. Das diversas opções analisadas no decorrer do estágio destacam-se as duas possibilidades descritas de seguida.

A DEROVO – DERIVADOS DE OVOS S.A. pode optar pela compra do equipamento (Shell Dryer R200 - OVOBEL®, BRUGES, BÉLGICA) que permite efetuar a secagem e descontaminação das elevadas quantidades de casca geradas pela empresa. No **Anexo I** podem verificar-se as características, o preço e as condições de pagamento do mesmo. Por outro lado, pode recorrer a uma pequena unidade de tratamento existente na empresa FERREIRA AVES LDA (Sever do Vouga), sugerida pela DGAV como alternativa à aquisição do equipamento.

Todavia, com a visita às instalações da FERREIRA AVES LDA e a observação do processo para obtenção de produto transformado de aves (frango), pelo método 1, sendo

a farinha comercializada como matéria-prima para *pet food*, para fertilizantes e corretivos agrícolas, surgiram algumas limitações processuais. A primeira dificuldade prende-se com o facto de, tipicamente, os produtos tratados na FERREIRA AVES LDA, serem provenientes de atividades da própria empresa, ou seja não processam produtos externos à sua atividade laboral. A humidade baixa da casca é outra questão problemática, uma vez que se desconheceria o efeito de processar casca de ovo em separado (processo sensivelmente semelhante ao que acontece numa autoclave).

Consequentemente, a solução mais viável passou a ser processar a casca de ovo juntamente com os restantes produtos, com a finalidade de aumentar o teor de cálcio da farinha resultante. Esta farinha seria comercializada como matéria-prima para alimentação animal para a OVARGADO- SOCIEDADE COMERCIAL E INDUSTRIAL DE ALIMENTOS PARA ANIMAIS S.A.

4.3. Desenvolvimento de uma ração com incorporação de casca de ovo - *PrOvo*

O estudo da composição mais adequada para a ração *PrOvo* foi efetuado em parceria com OVARGADO- SOCIEDADE COMERCIAL E INDUSTRIAL DE ALIMENTOS PARA ANIMAIS S.A. (ver **Tabela 10** e **Anexo J**).

Tabela 10 - Composição da ração *PrOvo*, resultante de uma incorporação de 3% de casca de ovo no Produto Transformado (FERREIRA AVES LDA).

Composição (%) da ração <i>PrOvo</i>	
Proteína	52,1
Gordura total	33
Humidade	8,2
Cinza total	8
Cálcio	2,3
Fósforo	0,96

A mais-valia da ração *PrOvo* seria o incremento de cálcio proveniente de uma fonte natural, que permite a substituição do CaCO_3 usado convencionalmente. Outra vantagem seria uma pequena adição de minerais e proteínas. Todavia, o preço acessível do CaCO_3 (1 tonelada \approx 20 €) e a percentagem de fósforo muito baixa (obriga a adição de fosfato monocálcico, com um custo mais elevado) poderiam ser fatores de entrave. Sem a alteração da composição da farinha da FERREIRA AVES LDA., a OVARGADO S.A. apenas poderia, numa produção de 50 toneladas/dia, usar \pm 37,5 kg do produto *Casca de Ovo*, ou seja 825 kg/mês.

A embalagem, sendo o primeiro contacto do consumidor com o produto, além de uma componente estética e apelativa, deve conferir proteção - barreira a contaminação microbiana, bem como controlar a humidade, oxigénio, dióxido de carbono e luz.

A embalagem pensada para este produto teria as dimensões de 80 x 46 x 9 cm e capacidade para 15 kg, pelo que a venda do produto nesta quantidade permitiria evitar o desperdício de matéria-prima (ver planificação no **Anexo K**). O tipo de embalagem escolhido foi o saco de papel Kraft branco cozido com fole, esta plasticização exterior serve para proteger o produto da humidade e torna o acondicionamento mais atrativo perante o potencial consumidor (**Figura 13**).



Figura 13 - Design da embalagem do produto.

A *PrOvo* surge com uma imagem simultaneamente simples, moderna e diferenciável, que remete para a incorporação de casca como fonte natural de cálcio. A cor amarela, criteriosamente escolhida, está associada à imagem da DEROVO – DERIVADOS DE OVOS S.A. Quanto à fonte para a letra da embalagem, optou-se por um tipo de letra simples e legível em conformidade com o teor informativo. Este produto seria dirigido a um público-alvo preocupado com a saúde e bem-estar do seu animal de estimação, com alguma capacidade económica. A forte componente ambiental, devido ao reaproveitamento de casca de ovo, também é uma mais-valia considerável face aos restantes concorrentes do mercado.

O mercado Chinês poderia vir a ser uma aposta de sucesso no futuro, dadas as recentes notícias dos gastos avultados com os animais de estimação. De facto, a política do “filho único” aliada a condições económicas favoráveis, têm permitido a expansão deste sector (ConnectAmericas, 2014; Diario de Noticias, 2014).

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises microbianas

As análises microbianas realizadas à casca possibilitaram a sua caracterização microbiológica. A contagem e determinação de UFC/g foi realizada, sendo o resultado expresso em Log_{10} UFC/g, bem como a verificação de existência ou não de uniformidade em termos microbianos nas diversas amostras analisadas.

5.1.1. *Escherichia coli*

Os resultados obtidos para as contagens de *Escherichia coli* nas amostras de casca triturada resultaram em valores diferentes no decorrer dos quatro ensaios (ver **Figura 14**). As cargas microbianas de *Escherichia coli* foram $3,85 \pm 0,55 \text{ Log}_{10}$ UFC/g e $3,85 \pm 0,92 \text{ Log}_{10}$ UFC/g, para a amostra de casca recolhida às 9:50 h e às 14:50 h, respetivamente, verificando-se uma maior variabilidade nas amostras da tarde. Após um processo de esterilização em autoclave a elevada temperatura (133°C) durante 15 minutos os resultados obtidos encontravam-se abaixo do limite de deteção ($< 1,00 \text{ Log}_{10}$ UFC/g), o que indica que a esterilização nestas condições foi eficiente.

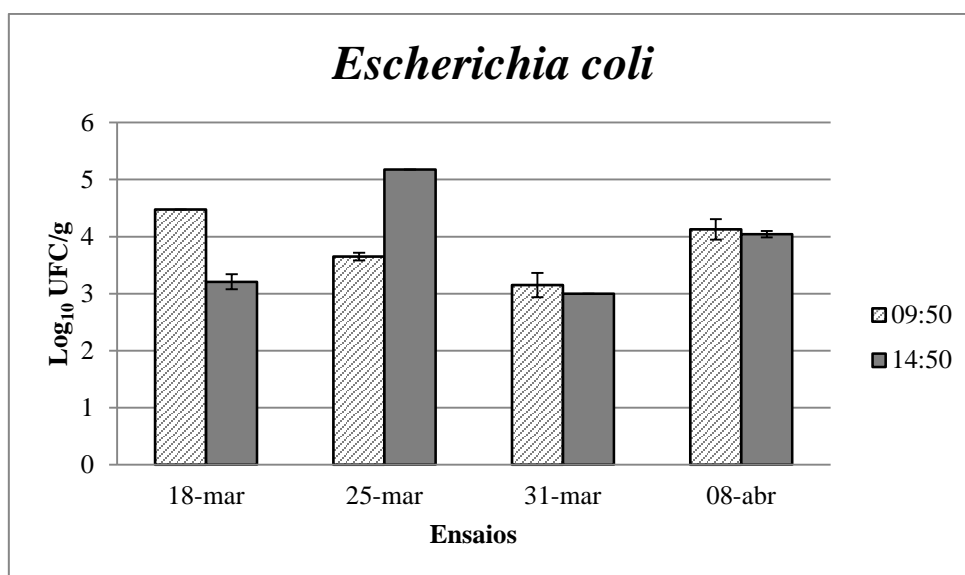


Figura 14 - Contagens microbianas de *Escherichia coli* presente na casca triturada (Log_{10} UFC/g), resultantes dos ensaios realizados a 18-mar, 25-mar, 31-mar e 08-abr. Os valores representados constituem a média de duas condições independentes, no caso o horário a que foi feita a recolha das amostras (9:50 h e 14:50 h) e os ensaios foram realizados em duplicado (duas réplicas). As barras de erro representam o desvio padrão. Foi ainda realizada a contagem microbiana da casca esterilizada em autoclave a 133°C durante 15 minutos, os resultados obtidos encontravam-se abaixo do limite de deteção ($< 1,00 \text{ Log}_{10}\text{UFC/g}$).

5.1.2. Coliformes

As cargas microbianas de coliformes foram de $4,23 \pm 0,32 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ para as amostras de casca triturada das 09:50 h e de $4,03 \pm 0,80 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ para as amostras de casca triturada das 14:50 h. Tal como os resultados obtidos anteriormente, não há uniformidade dos valores e as amostras recolhidas às 14:50 h apresentam maior variabilidade. Os resultados encontram-se abaixo do limite de deteção ($< 1,00 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$) no caso das amostras de casca esterilizada. Consequentemente, uma vez mais, as cargas microbianas de coliformes refletem a eficiência do processo de esterilização. A **Figura 15** ilustra a caracterização da casca resultante do processamento de ovoprodutos no que se refere às contagens microbianas de coliformes, a duas horas distintas do dia e ao longo de quatro ensaios realizados em duplicado.

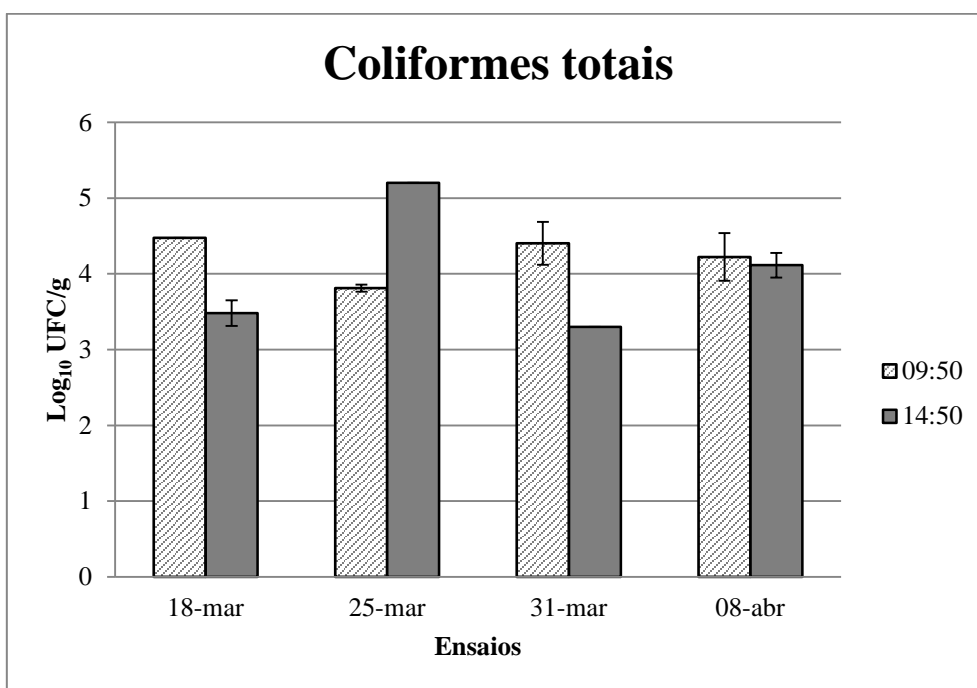


Figura 15 - Contagens microbianas de coliformes ($\text{Log}_{10} \text{ UFC/g}$) resultantes dos ensaios realizados a 18/mar, 25/mar, 31/mar e 08/abr. Os valores representados constituem a média de duas condições independentes (a hora a que foi feita a recolha das amostras) e os ensaios foram realizados em duplicado. As barras de erro representam o desvio padrão. Para a casca esterilizada em autoclave a 133°C durante 15 minutos os resultados obtidos encontravam-se abaixo do limite de deteção ($< 1,00 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$).

5.1.3. Enterobactérias totais

A média das contagens de enterobactérias totais das amostras de casca triturada recolhidas às 09:50 h foi de $4,73 \pm 0,51 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$. A mesma determinação para a casca triturada das 14:50 h resultou em $4,56 \pm 0,57 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$. Os resultados foram razoavelmente uniformes como se pode constatar na **Figura 16**. Quanto à variabilidade e, comparando a casca da manhã com a da tarde, foram sensivelmente semelhantes. Como expectável, a esterilização foi novamente eficiente, dado que as contagens, após processamento a altas temperaturas, se encontravam abaixo do limite de deteção ($< 1,00 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$).

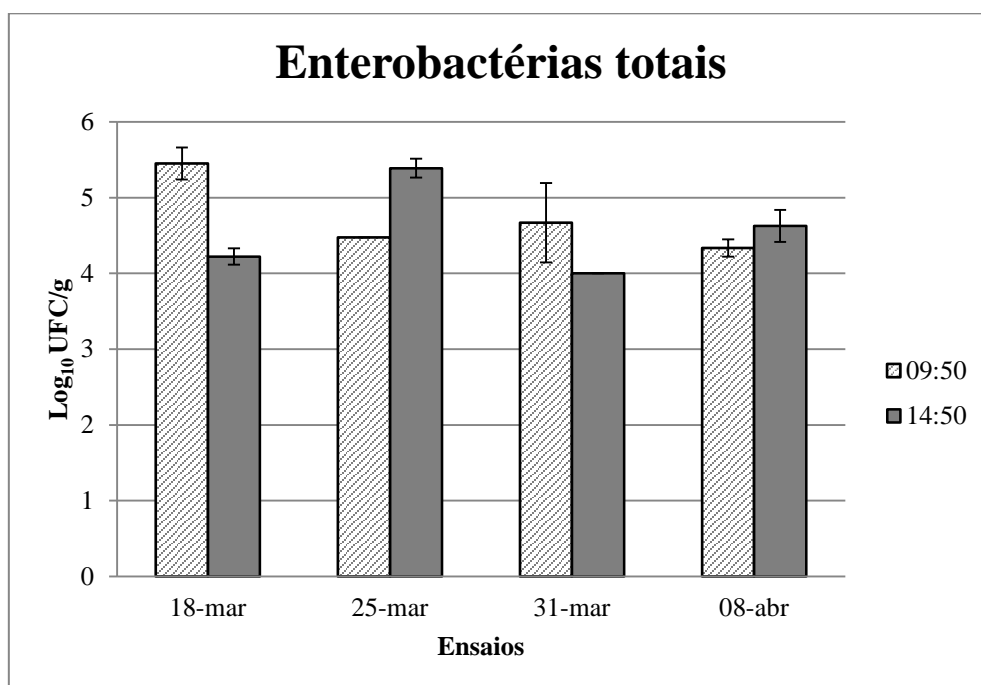


Figura 16 - Contagens microbianas de enterobactérias totais ($\text{Log}_{10} \text{ UFC/g}$) de amostras de casca triturada (invólucro e respetivas membranas aderidas), resultantes dos ensaios efetuados a 18/mar, 25/mar, 31/mar e 08/abr. Os valores representados constituem a média de duas condições independentes (9:50 h e 14:50 h) e foram efetuadas duas réplicas. As barras de erro indicam o desvio padrão. Os resultados obtidos encontravam-se abaixo do limite de deteção ($< 1,00 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$) para a casca esterilizada em autoclave a 133°C durante 15 minutos.

5.1.4. *Staphylococcus aureus*

As contagens de *Staphylococcus aureus* foram realizadas após 24 h e 48 h de incubação das placas de Petri em estufa bacteriológica (ISO 6888-2:1999). No entanto, graficamente apenas se apresenta a média das contagens efetuadas após a incubação

mais prolongada (ver **Figura 17**). Os valores obtidos resultantes da média de contagens de *Staphylococcus aureus* para a casca triturada (invólucro e membranas) recolhida às 09:50 h foram de $5,13 \pm 0,31 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$. A carga microbiana aumentou um pouco para a amostra das 14:50 h ($5,15 \pm 0,22 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$). Os resultados obtidos permitem verificar uma elevada uniformidade das diversas amostras face às contagens deste microrganismo. O processo de esterilização da casca a temperaturas altas foi eficiente dado que se obtiveram valores abaixo do limite de deteção ($<1,00 \text{ Log}_{10} \text{ UFC}$).

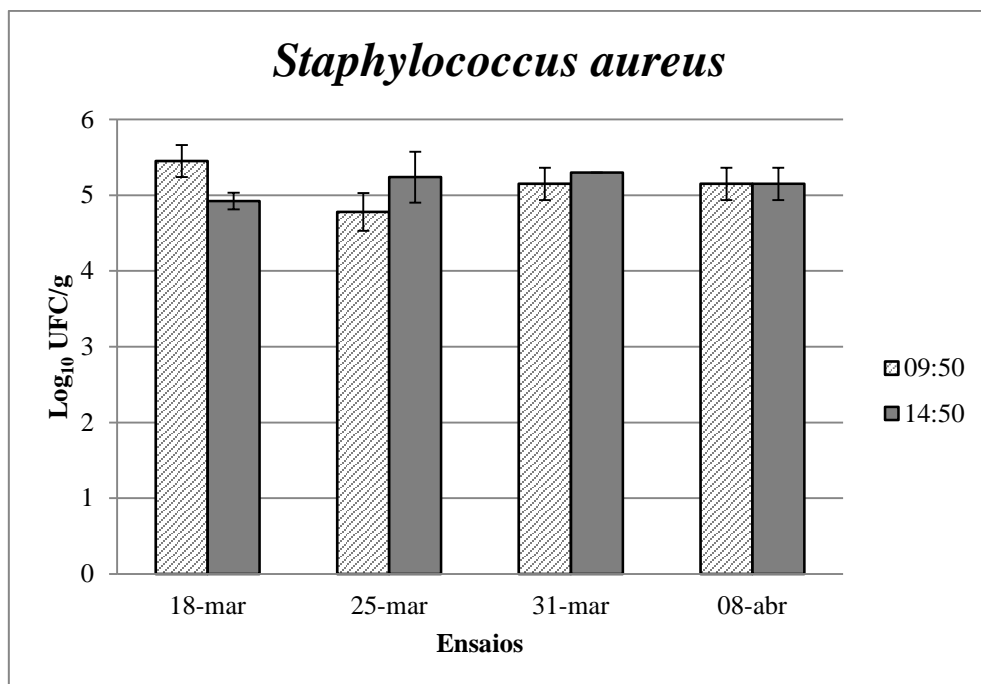


Figura 17 - Contagens microbianas de *Staphylococcus aureus* ($\text{Log}_{10} \text{ UFC/g}$) de amostras de casca triturada (invólucro e dupla membrana aderida), resultantes dos ensaios efetuados a 18/mar, 25/mar, 31/mar e 08/abr. Os valores representados constituem a média de duas condições independentes e os ensaios foram feitos em duplicado. As barras de erro representam o desvio padrão. Os resultados obtidos para a casca esterilizada (133°C , 15 min) encontravam-se abaixo do limite de deteção ($< 1,00 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$).

5.1.5. Mesófilos totais

As médias das contagens de mesófilos aeróbios totais da casca de ovo triturada foram de $6,08 \pm 0,24 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ e $6,38 \pm 0,21 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$, para as amostras das 09:50 h e das 14:50 h, respetivamente.

Estes ensaios de caracterização da casca ocorreram em diferentes dias e dois horários distintos (09:50 h e 14:50 h). A **Figura 18** permite constatar a uniformidade

das contagens de mesófilos aeróbios totais da casca triturada. Após esterilização das amostras as contagens efetuadas foram inferiores ao limite de detecção ($< 1,00 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$). Desta forma, pôde verificar-se que a esterilização foi novamente eficaz.

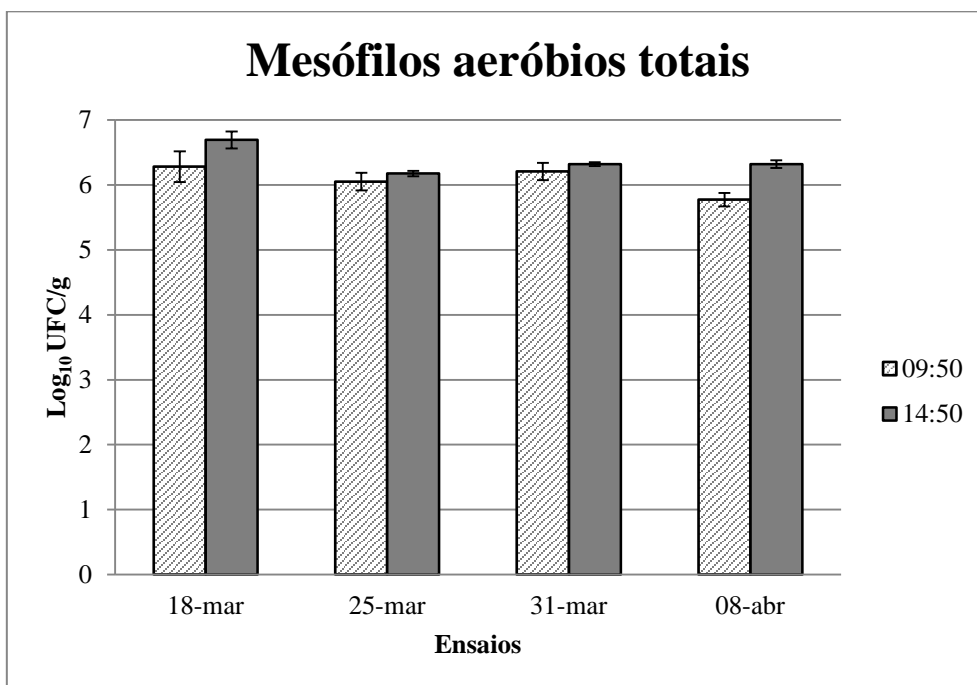


Figura 18 - Contagens microbianas de mesófilos aeróbios totais ($\text{Log}_{10} \text{ UFC/g}$) de amostras de casca triturada, resultantes de quatro ensaios. Os valores representados constituem a média de duas condições independentes e as determinações foram feitas em duplicado (duas réplicas). As barras de erro representam o desvio padrão. Os resultados obtidos para amostras de casca esterilizada encontravam-se abaixo do limite de detecção ($< 1,00 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$).

5.1.6. Bolores e leveduras

A determinação de bolores e leveduras nas amostras de casca de ovo também foi efetuada. Na **Figura 19** pode verificar-se que as amostras, no que concerne às contagens destes microrganismos, são bastante homogêneas, pois há uma grande uniformidade dos resultados obtidos ($5,28 \pm 0,42 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ às 09:50 h e $5,26 \pm 0,35 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ às 14:50 h). No entanto, o desvio padrão indica maior variabilidade das amostras da manhã. As amostras sujeitas a um processo de esterilização em autoclave (133°C , 15 min) evidenciaram a eficiência do procedimento nessas condições já que se obtiveram valores abaixo do limite de detecção ($< 1,00 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$).

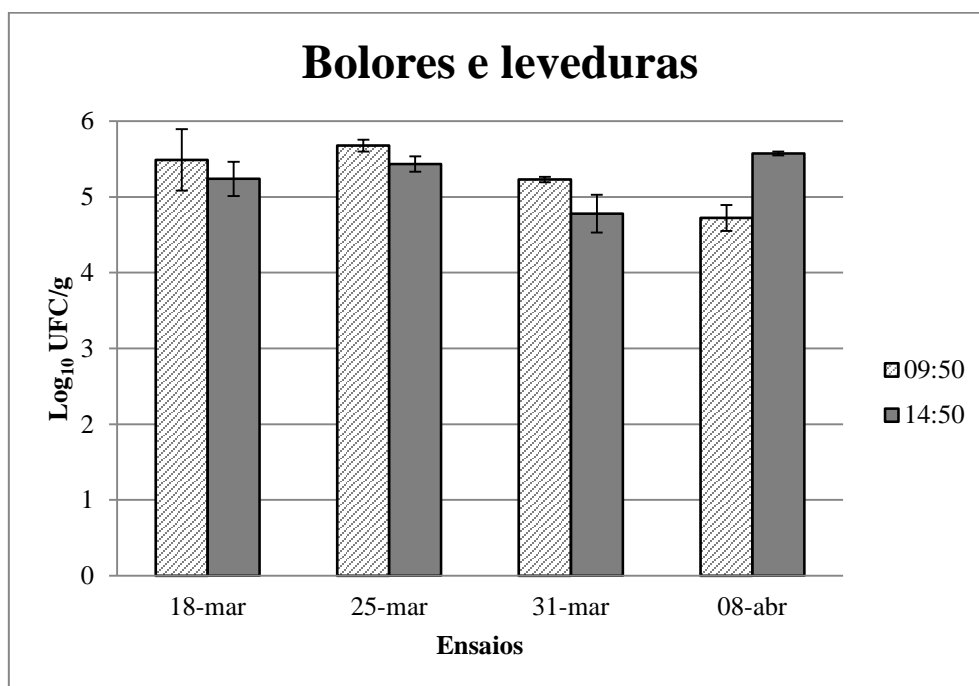


Figura 19 - Contagens microbianas de bolores e leveduras (Log_{10} UFC/g) de amostras de casca triturada, resultantes de diferentes ensaios. Os resultados apresentados são relativos à média de duas condições independentes (09:50 h e 14:50 h) e de duas réplicas. As barras de erro representam o desvio padrão. A casca esterilizada resultou em valores abaixo do limite de deteção ($< 1,00 \text{ Log}_{10}\text{UFC/g}$).

5.1.7. Enterococcus

No que se refere aos teores de enterococcus (**Figura 20**), pode concluir-se que os resultados não são uniformes. As médias das contagens foram respetivamente $3,75 \pm 0,93 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ e $4,19 \pm 0,33 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$, se a amostra de casca triturada foi recolhida durante a manhã ou à tarde, respetivamente. Os resultados indicam também maior variabilidade das amostras da manhã em relação às da tarde. Os valores para as amostras de casca esterilizada em autoclave evidenciaram novamente a eficiência do processo ($< 1,00 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$).

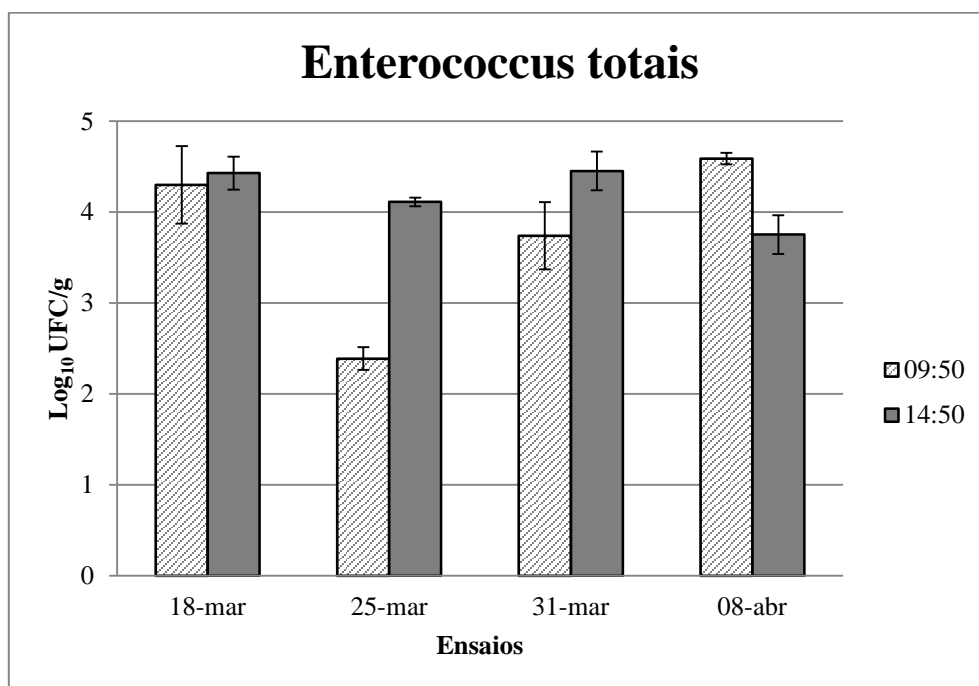


Figura 20 - Contagens microbianas de enterococcus totais (Log₁₀ UFC/g) de amostras de casca de ovo triturada, resultantes de diferentes ensaios. Os resultados apresentados são referentes à média de duas condições independentes (09:50 h e 14:50 h) e de duas réplicas. As barras de erro representam o desvio padrão. A esterilização da casca resultou em valores inferiores ao limite de detecção (< 1,00 Log₁₀UFC/g).

5.2. Detecção de *Salmonella* e *Listeria*

A presença de *Salmonella* e *Listeria* foi verificada em algumas amostras de casca triturada. Estes resultados positivos foram devidamente confirmados pelas análises externas, efectuadas para ambos microrganismos, pela EMPRESA SUBCONTRATADA A. Contudo, após o processo de esterilização em autoclave (133 °C, 15 min), obteve-se 100% de ausência de *Salmonella*/25g de amostra e de *Listeria*/25g de amostra, o que evidencia a eficiência do processo de esterilização.

5.2.1. *Salmonella*

Globalmente foram realizados 11 ensaios para detecção de ausência/presença de *Salmonella* em 25 g de amostra. Nos primeiros 4 ensaios foram estudadas exclusivamente amostras de casca triturada e, a partir do 5º ensaio (a 25/fev/2015), amostras de casca esterilizada também foram analisadas.

Os relatórios impressos pelo mini VIDAS® na deteção de *Salmonella* encontram-se no **Anexo L** e, mediante a observação da **Figura 21**, pode concluir-se que foi detetada presença de *Salmonella* maioritariamente nas amostras de casca triturada recolhidas pela manhã (27%) em relação às amostras de casca triturada das 14:50 h (18%).

A casca poderia estar contaminada com *Salmonella spp.* devido a infeção no oviduto ou por contaminação fecal (**De Reu et al., 2008**). A deteção qualitativa de elevados níveis de contaminação de agentes patogénicos em fezes de galinhas poedeiras e na casca, não implica a sua presença no conteúdo do ovo (**García et al., 2011**). **Howard et al. (2012)** concluíram que, em condições naturais, encontrar microrganismos no interior do ovo é raro e, quando ocorre infeção, os danos geralmente são visíveis. A única exceção, a *Salmonella enteritidis*, parece ter a capacidade de migrar para o interior do ovo e multiplicar-se sem induzir mudanças perceptíveis.

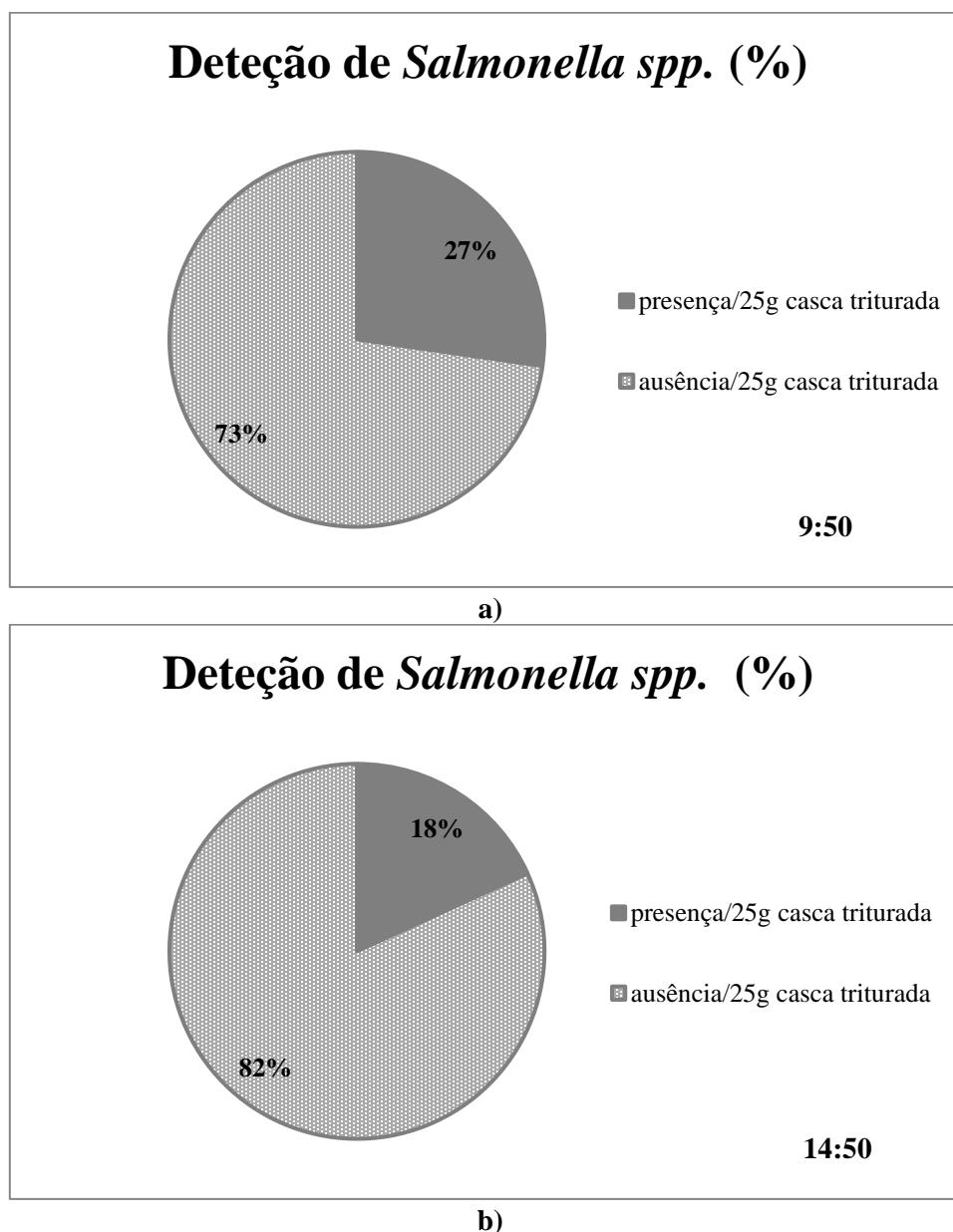


Figura 21 - Deteção de presença ou ausência (%) de *Salmonella* spp. em 25 g de amostras de casca triturada (invólucro e dupla membrana) recolhidas **a)** às 09:50 h **b)** às 14:50 h. A mesma determinação foi efetuada para amostras de casca esterilizada em autoclave (133 °C, 15 min) e, em ambos os casos, obteve-se 100% de ausência do agente patogénico/25g de casca esterilizada.

5.2.2. *Listeria*

Para a deteção de *Listeria* em 25 g de amostras de casca triturada foram efetuados 10 ensaios e, tal como anteriormente, a partir de 25/fev/2015 o estudo foi alargado a amostras de casca esterilizada em autoclave a 133 °C durante 15 minutos.

Os relatórios impressos pelo mini VIDAS® na deteção de *Listeria* encontram-se no **Anexo M** e, para a totalidade das determinações (tanto às 09:50 h como às 14:50 h) obteve-se 100% de presença de *Listeria*/25g de casca triturada.

Um fator que pode ter influenciado os resultados obtidos prende-se com uma das capacidades do microrganismo, mais concretamente, o facto da *Listeria monocytogenes* produzir biofilmes em ambiente de processamento alimentar (**Bonsaglia et al., 2014; Kadam et al., 2013**). Os biofilmes facilitam a persistência deste agente patogénico, conferindo resistência a processos de limpeza e de desinfeção (**Bonsaglia et al., 2014**). Estes agregados de células são frequente e amplamente conhecidos como fonte de infeção e diversos fatores influenciam a sua formação e desenvolvimento, como as propriedades dos materiais da superfície e parâmetros ambientais (pH, temperatura e nutrientes) (**Srey et al., 2013**). **Bonsaglia et al. (2014)** reportaram que a *Listeria monocytogenes* consegue formar biofilmes em diferentes superfícies usadas no processamento de alimentos e a diferentes temperaturas, incluindo refrigeração.

5. 3. Análises físico-químicas

5. 3.1. Humidade da casca

Tal como expectável, no decorrer do processo de esterilização a altas temperaturas, a água evaporou e, consequentemente, a humidade da casca decresceu (**Figura 22**).

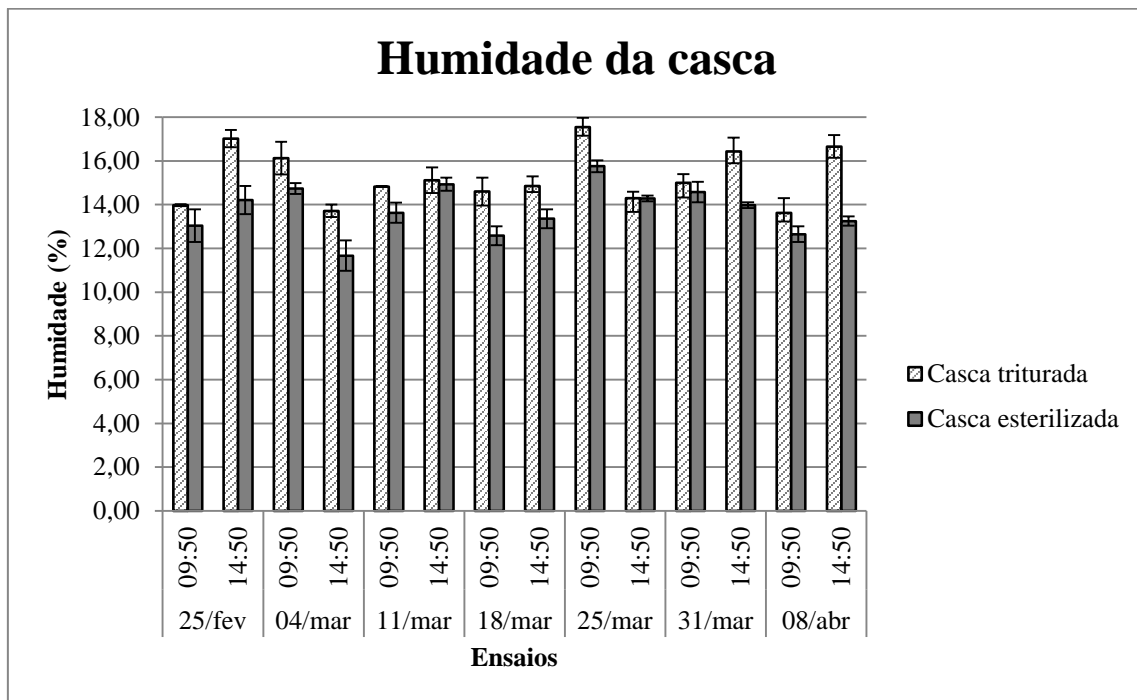


Figura 22 - Percentagem de humidade em diversas amostras de casca de ovo triturada e esterilizada. Os valores representados constituem a média de duas medições. As barras de erro representam o desvio padrão.

Da observação da figura pode ainda verificar-se que a percentagem de humidade da casca esterilizada ($13,76 \pm 1,17\%$) apresenta valores mais estáveis comparativamente à casca triturada ($15,27 \pm 1,34\%$).

De acordo com os resultados obtidos ao longo dos ensaios, a ficha técnica da empresa (referente à casca triturada) deverá ser atualizada, pois o intervalo de humidade da casca deverá decrescer para valores compreendidos entre 13 - 18%, dado que atualmente se encontra entre 15 e 20%.

5.4. Análise de parâmetros constituintes da casca de ovo

A composição da casca de ovo foi estudada com algum detalhe (ver **Tabela 11**). Da análise da tabela, importa salientar que se obteve 31,0% de cálcio na casca triturada e 1,9% de colagénio (19% de proteína) na dupla membrana.

Tabela 11 - Determinação de alguns parâmetros da composição da casca de ovo (análises efetuadas pela EMPRESA SUBCONTRATADA B).

Parâmetro	Resultado
Carbonato de cálcio (CaCO_3)	77,4%
Cálcio (Ca)	31,0%
Fósforo total	< 0,05%
Carbonato de magnésio (MgCO_3)	0,94%
Azoto total (N)	0,9%
Cinza total	78,4%
Zinco (Zn)	8,4 mg/kg
Magnésio (Mg)	0,27%
Cobre (Cu)	< 5 mg/kg
Potássio (K)	0,04%
Ferro (Fe)	13 mg/kg
Estrôncio	< 200 $\mu\text{g/kg}$ Sr
Vitamina D2	< 40 $\mu\text{g/kg}$
Vitamina D3	< 40 $\mu\text{g/kg}$
Colagénio	1,9% (*)
Manganês (Mn)	< 0,0005%
Sódio (Na)	0,09%

(*) – A determinação do parâmetro foi efetuada nas membranas apenas.

Os resultados obtidos para o cálcio foram ligeiramente inferiores aos encontrados na literatura (38 a 39%) (Schaafsma et al., 2000; Schaafsma e Beelen, 1999).

VI. CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

Neste trabalho foram estudadas novas formas de utilização e valorização da casca de ovo (no âmbito nacional e internacional) e analisados vários parâmetros microbiológicos e físico-químicos antes e após esterilização em autoclave (133 °C, 15 min), a fim de caracterizar as cascas produzidas na empresa. A detecção de agentes patogénicos, no caso a *Salmonella* e a *Listeria*, também foi estudada para amostras de casca triturada e esterilizada. Em laboratórios externos à empresa foram também determinados alguns parâmetros da composição da casca.

As cargas microbianas de *Staphylococcus aureus*, mesófilos aeróbios totais, e bolores e leveduras revelaram uma elevada uniformidade no decorrer dos diversos ensaios, o que não se verificou com a *Escherichia coli*, coliformes totais, enterococcus e enterobactérias. A eficiência da esterilização foi comprovada, uma vez que todas as contagens realizadas se encontravam abaixo do limite de detecção ($< 1,00 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$).

Globalmente foi detetada a presença de *Salmonella* em 22,5% dos ensaios realizados em amostras de casca triturada (recolhidas às 09:50 h e 14:50 h). A *Listeria* teve uma enorme prevalência no decorrer de todos os ensaios (100% presença de *Listeria*/25 g de casca triturada). No entanto, para ambos os agentes patogénicos, o processo de esterilização revelou ser eficaz (100% ausência agentes patogénicos/25 g de casca esterilizada).

O processo de esterilização da casca de ovo a elevadas temperaturas, com consequente evaporação de água, levou a um valor médio de percentagem de humidade menor ($13,76 \pm 1,17\%$) comparativamente com a casca triturada ($15,27 \pm 1,34\%$). Para este mesmo parâmetro foi verificada uma maior estabilidade dos resultados obtidos para as amostras de casca esterilizada.

Mediante o estudo de alguns parâmetros da composição do resíduo, obteve-se o valor de 31% de cálcio, daí a mais-valia da casca de ovo como substituto do carbonato de cálcio, usado convencionalmente em ração animal. Contudo, deve-se ter em consideração o custo reduzido do CaCO_3 (1 tonelada ≈ 20 €). Na proposta estudada, a incorporação de 3% de casca de ovo no produto transformado da FERREIRA AVES, LDA., resultou no incremento do teor de cálcio. Porém, sem a alteração da composição da farinha comercializada pela FERREIRA AVES, a percentagem obtida de fósforo (0,96%) seria muito baixa o que obrigaria à adição de fosfato monocalcico (mais caro) e o teor

de gordura alto levaria, numa produção de 50 toneladas/dia, à utilização de apenas \pm 37,5 kg de casca, ou seja 825 kg/mês.

Tendo em conta os resultados obtidos no presente trabalho, outros estudos são necessários a fim de avançar o conhecimento científico nesta área. No que concerne à humidade da casca (%), seria necessário verificar se a oscilação dos resultados está associada às variações da humidade do ar nos dias em que foram realizados os ensaios. No seguimento do estudo seria também interessante determinar a percentagem de proteína na amostra da casca triturada (invólucro e membranas) e caso fosse superior a 10%, a incorporação de casca também seria vantajosa como fonte de proteína, importante em rações de galinhas e cães. Outra possibilidade é estudar se a proteína da casca é rica especificamente em metionina, dado que este aminoácido é uma matéria-prima em falta em aves e porcos-iniciação. Na eventualidade da farinha da FERREIRA AVES reduzir para metade o teor de gordura total, os restantes parâmetros teriam uma composição superior e seria possível uma maior incorporação de casca.

Por fim, é de realçar o quanto enriquecedor foi este período de estágio que, ao ser desenvolvido em contexto empresarial, permitiu adquirir competências em diversas áreas, como controlo da qualidade, logística e em todo o processo industrial inerente. Todos estes conhecimentos contribuíram para crescimento pessoal e profissional e poderão ser uma mais-valia no futuro.

VII. OUTROS TRABALHOS

No decorrer deste estágio em ambiente empresarial, outros trabalhos foram realizados para a empresa como o controlo de pré-embalados e embalados, controlo de pragas, análises de rotina, entre outros (**Figura 23**).



Figura 23 - Outros trabalhos desenvolvidos na entidade de acolhimento do estágio.

VIII. REFERÊNCIAS

- Agência Portuguesa do Ambiente. (2011). Licença ambiental. Retrieved October 02, 2014, from http://ladigital.apambiente.pt/6.4bi/Derovo - Derivados de Ovos/419_2011 Derovo - Derivados de ovos.pdf
- Albuquerque, T. G., Oliveira, M. B. P. P., Sanches-Silva, A., & Costa, H. S. (2014). *Cholesterol determination in foods: Comparison between high performance and ultra-high performance liquid chromatography*. *Food Chemistry*.
- Araujo, A. (2013). Atalho para o biodiesel. Retrieved December 22, 2014, from <https://www.ufmg.br/boletim/bol1833/4.shtml>
- ASAE. (2014). Salmonella. Retrieved December 09, 2014, from <http://www.asae.pt/?cn=541054135462AAAAAAAAAAAAA>
- Baláž, M. (2014). Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 10, pp. 3827–3843).
- Belitz, H., & Grosch, W. (1988). Huevos. In H. Belitz & W. Grosch (Eds.), *Química de los Alimentos* (pp. 433–446). Editorial Acribia S.A.
- Belitz, H., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). Eggs. In *Food Chemistry* (pp. 546–562). Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-540-69934-7>
- Bellairs, R., & Osmond, M. (2014). The Hen's Egg and its Formation. In R. Bellairs & M. Osmond (Eds.), *The Atlas of Chick Development* (Third Edit., pp. 1–6). Elsevier Academic Express.
- bioMérieux SA. (2005). *Manual de Utilização mini VIDAS®* (Version B.). França.
- Biomérieux Industry. (2014). Vidas. Retrieved March 10, 2015, from http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/VIDAS_English.pdf
- Blesso, C. N. (2015). Egg phospholipids and cardiovascular health. *Nutrients*, 7(4), 2731–2747. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4425170&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Fernandes Júnior, A., Araújo Júnior, J. P., Tsunemi, M. H., & Rall, V. L. M. (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*, 35, 386–391.
- Botey-Saló, P., Anyogu, A., Varnam, A. H., & Sutherland, J. P. (2012). Survival of inoculated *Salmonella* on the shell of hens' eggs and its potential significance. *Food Control*, 28, 463–469.
- Bourgeois, C., Mescle, J., & Zucca, J. (1996). les défenses naturelles de l'oeuf. In C. Bourgeois, J. Mescle, & J. Zucca (Eds.), *Microbiologie alimentaire* (pp. 296–311). TEC ET DOC / LAVOISIER.

- Brewer, S. (2013). Natural Eggshell Membrane (NEM). Retrieved December 22, 2014, from <http://nutritionexpert.healthspan.co.uk/natural-eggshell-membrane>
- Britton, W., & Hale, K. (1977). Amino acid analysis of shell membranes of eggs from young and old hens varying in shell quality. *Poultry Science*, 56(1), 865–871.
- Caldeira, C. (2011). A Derovo - Derivado de Ovos, sediada em Pombal, e liderada por Amândio Santos, foi a vencedora do Prémio PME Inovação COTEC-BPI, com o apoio do jornal “Público.” Retrieved October 06, 2014, from http://economico.sapo.pt/noticias/derovo-ganha-premio-pme-inovacao-cotec_133118.html
- Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & García-Gimeno, R. M. (2012). Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: A review. *Food Research International*, 45(2), 545–556.
- Cataño, L. (2013). Cáscara de huevo para descontaminar el agua. Retrieved December 22, 2014, from http://www.elmundo.com/portal/noticias/territorio/cascara_de_huevo_para_descontaminar_el_agua.php#.VJmpkl4jB
- Chagas, P., Caramori, P., Galdino, T. P., Barcellos, C. da S. de, Gomes, I., & Schwanke, C. H. A. (2013). Egg consumption and coronary atherosclerotic burden. *Atherosclerosis*, 229(2), 381–384.
- Cherian, G. (2011). Eggs and Health: Nutrient Sources and Supplement Carriers. In R. Watson (Ed.), *Complementary and alternative therapies and the aging population* (pp. 333–345). Elsevier Academic Express.
- Chousalkar, K. K., Flynn, P., Sutherland, M., Roberts, J. R., & Cheetham, B. F. (2010). Recovery of Salmonella and Escherichia coli from commercial egg shells and effect of translucency on bacterial penetration in eggs. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 207–213.
- CNN. (2013). Scientists hatch plan to recycle eggshells into plastic. Retrieved December 22, 2014, from <http://edition.cnn.com/2012/04/03/tech/eco-egg-plastic/>
- Cohn, J. S., Kamili, A., Wat, E., Chung, R. W. S., & Tandy, S. (2010a). Dietary phospholipids and intestinal cholesterol absorption. *Nutrients*, 2, 116–127.
- Cohn, J. S., Kamili, A., Wat, E., Chung, R. W. S., & Tandy, S. (2010b). Reduction in intestinal cholesterol absorption by various food components: Mechanisms and implications. *Atherosclerosis Supplements*, 11, 45–48.
- ConnectAmericas. (2014). Cães e gatos, dois clientes estrelas da indústria alimentar. Retrieved May 27, 2015, from <https://connectamericas.com/pt/content/cães-e-gatos-dois-clientes-estrelas-da-indústria-alimentar>

- Consejo Superior de Investigaciones Científicas. (2004). Reciclaje y valorización de residuos. Un método permite obtener lactulosa con cáscara de huevo. Retrieved December 22, 2014, from <http://www.ott.csic.es/rdcsic/rdcsicesp/rdal10esp.htm>
- COTEC Portugal. (2008). Derovo - Derivados de ovos, SA. Retrieved October 07, 2014, from http://www.cotecportugal.pt/index.php?option=com_content&task=view&id=816
- Cronista. (2014). Cuando los residuos dejan de ser un problema para transformarse en insumos. Retrieved December 21, 2014, from <http://www.notasdeactualidad.com.ar/cuando-los-residuos-dejan-de-ser-un-problema-para-transformarse-en-insumos/>
- De Reu, K., Grijspeerdt, K., Messens, W., Heyndrickx, M., Uyttendaele, M., Debevere, J., & Herman, L. (2008). Bacterial contamination of table eggs and the influence of housing systems. *Poultry Science*, 64(1), 5–19.
- DEFRA. (2011). Controls on Animal By-Products. Retrieved December 22, 2014, from https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/69458/pb13688-animal-by-products-controls-111130.pdf
- Derovo Group. (2010). *Manual de Acolhimento*.
- Derovo Group. (2013). Filme institucional-“O PODER DO OVO.” Retrieved October 02, 2014, from <http://www.youtube.com/watch?v=AJm9dEj9CTU&hd=1>
- Derovo Group. (2014). O poder do Ovo. Retrieved October 06, 2014, from <http://www.derovo.com>
- Diário de Notícias, 2014. (2014). Chineses gastam mil milhões com os animais de estimação - Globo - DN. Retrieved May 27, 2015, from http://www.dn.pt/inicio/globo/interior.aspx?content_id=4196908&seccao=sia&page=-1
- Domingo, J. L. (2014). Health risks of human exposure to chemical contaminants through egg consumption: A review. *Food Research International*, 56(1), 159–165.
- Dowsett, A. (2014). Science Photo Library. Retrieved December 03, 2014, from <http://www.sciencephoto.com/media/10956/view>
- Dunkley, K. D., Callaway, T. R., Chalova, V. I., McReynolds, J. L., Hume, M. E., Dunkley, C. S., ... Rieke, S. C. (2009). Foodborne Salmonella ecology in the avian gastrointestinal tract. *Anaerobe*, 15, 26–35.
- Dupoirieux, L., Pourquier, D., & Souyris, F. (1995). Powdered eggshell: a pilot study on a new bone substitute for use in maxillofacial surgery. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery: Official Publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 23, 187–194.
- Elias, I. (2010, February 18). Methods of Use of Eggshell Polypeptides. USA. Retrieved from https://www.google.pt/patents/US20100041606?hl=pt-PT&dq=METHODS+OF+USE+OF+EGGSHELL+POLYPEPTIDES&ei=5Um0VVKC2NYnyUt_BgrAE&cl=en

- Gallego, M. (2013). Cáscaras de huevo para descontaminar ríos. Retrieved December 22, 2014, from <http://vidamasverde.com/2013/cascaras-de-huevo-para-descontaminar-rios/>
- Gao, Y., & Xu, C. (2012). Synthesis of dimethyl carbonate over waste eggshell catalyst. *Catalysis Today*, 190, 107–111.
- García, C., Soriano, J. M., Benítez, V., & Catalá-Gregori, P. (2011). Assessment of *Salmonella* spp. in feces, cloacal swabs, and eggs (eggshell and content separately) from a laying hen farm. *Poultry Science*, 90, 1581–1585.
- Glas, C., & Schaafsma, A. (1996, May 30). Milk product enriched with ground eggshell. Google Patents. Retrieved from <https://www.google.pt/patents/WO1996015678A1?cl=en>
- Glatz, P., Miao, Z., & Rodda, B. (2011). Handling and treatment of poultry hatchery waste: A review. *Sustainability*, 3(1), 216–237.
- Goldberg, S., Gardener, H., Tiozzo, E., Kuen, C. Y., Elkind, M. S. V, Sacco, R. L., & Rundek, T. (2014). Egg consumption and carotid atherosclerosis in the Northern Manhattan study. *Atherosclerosis*, 235, 273–280.
- Gole, V. C., Roberts, J. R., Sexton, M., May, D., Kiermeier, A., & Chousalkar, K. K. (2014). Effect of egg washing and correlation between cuticle and egg penetration by various *Salmonella* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 182–183, 18–25.
- Guru, P. S., & Dash, S. (2014). Sorption on eggshell waste - A review on ultrastructure, biomineralization and other applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 209, 49–67.
- Hierro, E., Manzano, S., Ordóñez, J. A., de la Hoz, L., & Fernández, M. (2009). Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on shell eggs by pulsed light technology. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 125–130.
- Hincke, M. T., Gautron, J., Panheleux, M., Garcia-Ruiz, J., McKee, M. D., & Nys, Y. (2000). Identification and localization of lysozyme as a component of eggshell membranes and eggshell matrix. *Matrix Biology*.
- Hincke, M. T., Nys, Y., & Gautron, J. (2010). The Role of Matrix Proteins in Eggshell Formation. *The Journal of Poultry Science*, 47(3), 208–219.
- Houston, D. K., Ding, J., Lee, J. S., Garcia, M., Kanaya, A. M., Tylavsky, F. A., ... Kritchevsky, S. B. (2011). Dietary fat and cholesterol and risk of cardiovascular disease in older adults: The Health ABC Study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21, 430–437.
- Howard, Z. R., O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., & Ricke, S. C. (2012). *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. *Food Research International*, 45, 755–764.
- inCentea. (2005). Operação ovos quadrados. Retrieved October 06, 2014, from <http://www.incentea.pt/portalincentea/CSDERGEX05v02.pdf>

- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (2005). Eggs and egg products. In International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (Ed.), *Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities* (First Edit., pp. 475–511). Blackie Academic & Professional.
- Jay, J. (1995). Foodborne gastroenterites caused by Salmonella and Shigella. In J. Jay (Ed.), *Modern food microbiology* (Fifth Edit., pp. 507–523). Food Science Texts.
- Kadam, S. R., den Besten, H. M. W., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., & Abee, T. (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology*, 165, 259–264.
- Kim, J., Kim, M. S., Oh, H., Lee, H., Park, J., Lee, B., ... Erkhembaatar, M. (2013). Treatment of eggshell with casein phosphopeptide reduces the severity of ovariectomy-induced bone loss. *Laboratory Animal Research*, 29, 70–76.
- Latimer, H. K., Jaykus, L. A., Morales, R. A., Cowen, P., & Crawford-Brown, D. (2002). Sensitivity analysis of *Salmonella enteritidis* levels in contaminated shell eggs using a biphasic growth model. *International Journal of Food Microbiology*, 75, 71–87.
- Leleu, S., Herman, L., Heyndrickx, M., De Reu, K., Michiels, C. W., De Baerdemaeker, J., & Messens, W. (2011). Effects on *Salmonella* shell contamination and trans-shell penetration of coating hens' eggs with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 43–48.
- Li, Y., Zhou, C., Zhou, X., & Li, L. (2013). Egg consumption and risk of cardiovascular diseases and diabetes: A meta-analysis. *Atherosclerosis*, 229, 524–530.
- Li-Chan, E., Powrie, W., & Nakai, S. (1995). The Chemistry of Eggs and Egg Products. In W. Stadelman & O. Cotterill (Eds.), *Egg Science and Technology* (Fourth Edi., pp. 105–175). Food Products Press.
- Linden, G., & Lorient, D. (2007). Ovoproduits. In *Biochimie agro-industrielle: Valorisation alimentaire de la production agricole* (pp. 121–137). Elsevier Academic Express.
- Long, F. (2008, September 16). Therapeutic, nutraceutical and cosmetic applications for eggshell membrane and processed eggshell membrane preparations. USA. Retrieved from <https://www.google.pt/patents/US20040180025?hl=pt-PT&dq=Cosmetic+composition,+e.g.+emulsion+cold+cream+or+powder+make-up&ei=V160Vnn6KsavU-KmgqgE&cl=en>
- MacNeil, J. H. (2001, January 23). Method and apparatus for separating a protein membrane and shell material in waste egg shells. USA. Retrieved from <https://www.google.pt/patents/US6176376?dq=Method+and+apparatus+for+separating+a+protein+membrane+and+shell+material+in+waste+egg+shells&hl=pt-PT&sa=X&ei=Qz20VMY7NYG9UPCYhIgN&ved=0CCAQ6AEwAA>

- Magalhães, M. C., Ribeiro, A., Quina, M., Cameira, C., & Soares, M. (2011). Tratamento e valorização agrícola da casca de ovo. *Revista de Ciências Agrárias*, 34(2), 191–204. Retrieved from http://www.scielo.gpeari.mctes.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2011000200018&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
- Magdelaine, P. (2011). Egg and egg product production and consumption in Europe and the rest of the world. In Y. Nys, M. Bain, & F. V. B. T. Immerseel (Eds.), *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products. Volume 1: Egg Chemistry, production and consumption* (pp. 3–16). Woodhead Publishing.
- Martelli, F., & Davies, R. H. (2012). Salmonella serovars isolated from table eggs: An overview. *Food Research International*, 45, 745–754.
- Mattler Toledo. (2007). *Manual de instruções Moisture Analyser HB43-S*. Suíça.
- McNamara, D. J., & Thesmar, H. S. (2005). Eggs. In A. Caballero, Benjamin; Allen, Lyndsay; Prentice (Ed.), *Encyclopedia of Human Nutrition* (pp. 86–92). Elsevier Academic Express.
- Mijan, M. Al, Kim, D.-H., & Kwak, H.-S. (2014). Physicochemical properties of nanopowdered eggshell. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(7), 1751–1757.
- Mine, Y., & Zhang, H. (2013). Egg Components in Food Systems. In M. Eskin & F. Shahidi (Eds.), *Biochemistry of Foods* (pp. 215–241). Academic Press.
- Nakano, T., Ikawa, N., & Ozimek, L. (2001). Extraction of glycosaminoglycans from chicken eggshell. *Poultry Science*, 80, 681–684.
- Nakano, T., Ikawa, N., & Ozimek, L. (2003). Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes. *Poultry Science*, 82, 510–514.
- Naviglio, D., Gallo, M., Grottaglie, L. Le, Scala, C., Ferrara, L., & Santini, A. (2012). Determination of cholesterol in Italian chicken eggs. *Food Chemistry*, 132, 701–708.
- New, L. (2011, November 17). Eggshell membrane separation process. Google Patents. Retrieved from <https://www.google.pt/patents/CA2797232A1?cl=en>
- Nys, Y., Gautron, J., Garcia-Ruiz, J. M., & Hincke, M. T. (2004). Avian eggshell mineralization: Biochemical and functional characterization of matrix proteins. *Comptes Rendus - Palevol*, 3, 549–562.
- Nys, Y., & Guyot, N. (2011a). 6 - Egg formation and chemistry. In Y. Nys, M. Bain, & F. V. B. T.-I. the S. and Q. of E. and E. P. Immerseel (Eds.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 83–132). Woodhead Publishing. doi:<http://dx.doi.org/10.1533/9780857093912.2.83>
- Ockerman, H. W., & Hansen, C. L. (1994). *Industrialización de subproductos de origen animal*. (pp. 330–333). Acribia,.

- Oliveira, D. A., Benelli, P., & Amante, E. R. (2013). A literature review on adding value to solid residues: Egg shells. *Journal of Cleaner Production*, 46(1), 42–47.
- Pavlovski, Z., Škrbić, Z., Lukić, M., Vitorović, D., Lilić, S., & Petričević, V. (2012). Shell Quality - Everlasting problem in the today poultry science. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 28(3), 393–404.
- Pouillot, R., Hoelzer, K., Ramirez, G. a, DeGraft-Hanson, J., & Dennis, S. B. (2014). Assessment of the risk of salmonellosis from internally contaminated shell eggs following initial storage at 18 °C (65 °F), compared with 7 °C (45 °F). *Food Microbiology*, 43, 16–19.
- Ramanoff, R. (1949). *The Avian Egg*. (J. W. & S. Co, Ed.). New York.
- Ribeiro, A. (2014). Investigador da UMinho rentabiliza cascas de ovo para tratar resíduos. Retrieved December 22, 2014, from http://www.gmrtv.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=21809:uminho-investigador-vimaranense-rentabiliza-casca-de-ovo-para-tratar-residuos&catid=3:flash
- Rivera, E. M., Araiza, M., Brostow, W., Castaño, V. M., Díaz-Estrada, J. R., Hernández, R., & Rodríguez, J. R. (1999). Synthesis of hydroxyapatite from eggshells. *Materials Letters*, 41, 128–134.
- Rodrigue, D. C., Tauxe, R. V, & Rowe, B. (1990). International increase in Salmonella enteritidis: a new pandemic? *Epidemiology and Infection*, 105, 21–27.
- Ruff, K. J., Endres, J. R., Clewell, A. E., Szabo, J. R., & Schauss, A. G. (2012). Safety evaluation of a natural eggshell membrane-derived product. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 604–611.
- Sanosh, K. P., Chu, M. C., Balakrishnan, A., Kim, T. N., & Cho, S. J. (2009). Utilization of biowaste eggshells to synthesize nanocrystalline hydroxyapatite powders. *Materials Letters*, 63, 2100–2102.
- Schaafsma, A., & Beelen, G. (1999). Eggshell powder, a comparable or better source of calcium than purified calcium carbonate: piglet studies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(12), 1596–1600.
- Schaafsma, A., Pakan, I., Hofstede, G. J., Muskiet, F. A., Van Der Veer, E., & De Vries, P. J. (2000). Mineral, amino acid, and hormonal composition of chicken eggshell powder and the evaluation of its use in human nutrition. *Poultry Science*, 79, 1833–1838.
- Scheideler, S. E. (1998). Eggshell Calcium Effects on Egg Quality and Ca Digestibility in First- or Third-Cycle Laying Hens. *The Journal of Applied Poultry Research*, 7(1), 69–74.
- Secretaría de Ambiente y Desarrollo, M. de S. y A. (2005). ENGIRSU. Retrieved December 21, 2014, from http://www.ambiente.gov.ar/observatoriorsu/infoteca/archivos_para_bajar/ENGIRSU.pdf

- Shi, Z., Yuan, B., Zhang, C., Zhou, M., & Holmboe-Ottesen, G. (2011). Egg consumption and the risk of diabetes in adults, Jiangsu, China. *Nutrition*, 27, 194–198.
- SNEA e FNSA. (2009). Élimination responsable des déchets de couvoir | Département de développement de couvoir — world leader in the development of incubators and hatcheries. Retrieved December 22, 2014, from <http://www.petersime.com/fr/departement-de-developpement-de-couvoir/elimination-responsable-des-dechets-de-couvoir/>
- Sparks, N. (2014). Eggs; Microbiology of Fresh Eggs. In C. Batt & M. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edi., pp. 610–616). Elsevier Academic Express.
- Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S. Do. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31, 572–585.
- Tajima, T., & Kusamoto, N. (2010, August 3). Fiber, fiber assembly, and fiber producing method. Google Patents. Retrieved from <https://www.google.pt/patents/US7767297>
- Taylor, S., Penfield, M., & Campbell, A. (1990). Eggs. In S. Taylor, M. Penfield, & A. Campbell (Eds.), *Experimental Food Science* (Third Edit., pp. 130–161).
- Tecnológica, S. I. (2007). Cascas de ovos recicladas produzem colágeno e hidrogênio. Retrieved December 22, 2014, from <http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/noticia.php?artigo=010125071001#.VJnGIF4jA>
- Theron, H., Venter, P., & Lues, J. F. R. (2003). Bacterial growth on chicken eggs in various storage environments. *Food Research International*, 36, 969–975.
- Toro, P., Quijada, R., Yazdani-Pedram, M., & Arias, J. L. (2007). Eggshell, a new bio-filler for polypropylene composites. *Materials Letters*, 61, 4347–4350.
- UATEC. (2014). Ceramic slurry with the incorporation of eggshell. Retrieved March 25, 2015, from <http://uatec.innoget.com/university-of-aveiro-uatec/technologies/1249/Ceramic-slurry-with-the-incorporation-of-eggshell-waste>
- Universidade de Coimbra, . (2012). Reutilizar as cascas de ovo em prol do ambiente. Retrieved December 22, 2014, from <http://www.centrocienciajunior.com/novidades/novidade.asp?id=754>
- Universidade de Huelva, . (2009). Manejo Integral de Residuos Solidos. Retrieved December 22, 2014, from <http://www.uhu.es/sevirtual/ocw/politecnico/tecnicas-tratamiento-contaminacion/material/013.pdf>
- US EPA, O. ., & Office of Resource Conservation and Recovery, . (2013). History of RCRA | Wastes. Retrieved December 22, 2014, from <http://www.epa.gov/osw/laws-regs/rcrahistory.htm>
- Vaclavik, V., & Christian, E. (2003). Eggs and Egg Products. In D. Heldman (Ed.), *Essentials of food science* (Second Edi., pp. 187–213). Springer Berlin Heidelberg.

- Vaghefi, S. (2008). Myths and Misconceptions. In R. Watson (Ed.), *Eggs and Health Promotion* (pp. 83–101). Wiley.
- Vandepopullere, J.M., Walton, M. V., & Cotterill, O. J. (1975). Nutritional evaluation of eggshell meal. *Poultry Science*, 54(1), 131–135.
- Wan Norhana, M. N., Poole, S. E., Deeth, H. C., & Dykes, G. A. (2010). Prevalence, persistence and control of Salmonella and Listeria in shrimp and shrimp products: A review. *Food Control*, 21(4), 343–361.
- Wang, H., & Slavik, M. F. (1998). Bacterial penetration into eggs washed with various chemicals and stored at different temperatures and times. *Journal of Food Protection*, 61, 276–279.
- Wilcox, N. (2014). traitement-des-dechets-assainissement. Retrieved December 22, 2014, from <http://www.fnsa-vanid.org/docs/fnsa/publications/guide-traitement/traitement-des-dechets-assainissement.pdf>
- Wong, M., Hendrix, M. J., von der Mark, K., Little, C., & Stern, R. (1984). Collagen in the egg shell membranes of the hen. *Developmental Biology*, 104, 28–36.
- Wu, T. M., Rodriguez, J. P., Fink, D. J., Carrino, D. A., Blackwell, J., Caplan, A. I., & Heuer, A. H. (1995). Crystallization studies on avian eggshell membranes: implications for the molecular factors controlling eggshell formation. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 14, 507–513.
- Yoo, S., Hsieh, J. S., Zou, P., & Kokoszka, J. (2009). Utilization of calcium carbonate particles from eggshell waste as coating pigments for ink-jet printing paper. *Bioresource Technology*, 100, 6416–6421.
- Zhi, X. (2014, April 23). Nutrient fertilizer for planting flowers. Google Patents. Retrieved from <https://www.google.pt/patents/CN103739324A?cl=en>

ANEXOS

Anexo A – Gama de produtos comercializada pelo GRUPO DEROVO



Recheios

- Maçã Fresh: Balde 3kg.
- Mirtilo, Frutos Silvestres, Manga, **Morango**, Maçã Canela, Maçã e Ananás: Balde 6kg.
- Framboesa, Amora, Cereja: Balde 7kg.

Geleias

- Morango, Frutos Silvestres, Framboesa, Laranja, Manga, **Kiwi**, Maracujá, Ananás e Limão.
- Balde 6kg.

Brilhos

- Frio Neutro: Balde 1,5kg e 6,5kg.
- Frio de Caramelo, Frio de Chocolate e Brilho frio: Balde 7kg.
- Quente Neutro: Balde 13kg.

Cremes

- Creme Pasteleiro baunilha: Balde 6kg.
- Creme Limão: Balde 7kg.
- Creme Brigadeiro e Brigadeiro Escuro: Balde 7,5kg.
- Creme Pasteleiro: Balde 12kg.

Superpastas

- Café: Balde 7kg.
- Framboesa, Laranja, Morango, Ananás, Manga, Frutos Silvestres, Tiramisu, Maracujá e Whisky: Balde 6kg.

Iogurte Natural

- Iogurte Natural: Balde 3,5kg.
- Iogurte Natural Açucarado: Balde 3,5kg.

Sobremesas HORECA

- Leite Creme: Balde 3,5kg.
- Arroz Doce: Balde 3,5kg.
- Creme de Chocolate: Balde 3,5kg.

Crocantes

- Amêndoas: 5kg x 2 un.
- Amendoim: 5kg x 2 un. e 1kg x 10 un.

Toppings

- Caramelo, Chocolate, Morango e Frutos Silvestres.
- Embalagem de 1,2kg (caixa 6 un.).

Para quem precisa de mais!

Suplemento proteico pronto a beber para um corpo mais definido, mais massa muscular e menos massa gorda, de forma prática, saborosa e saciante.

DISPONÍVEL NOS SABORES MORANGO E BAUNILHA.

www.fullprotein.com



derovo GROUP
Parque Ind. Manuel da Mota, 30
3100-354 Pombal - T. 236 209 823
www.deroovo.com

NOVO

Clara de ovo pasteurizada, em embalagens de 320 ml, o equivalente a 10 claras.

Seguro, prático e sem desperdícios, ideal para cozinhados, doçaria, desportistas e dietas hiperproteicas.

SOLUÇÕES PRÁTICAS E ECONÓMICAS PARA O MERCADO B2C.

NOVO

Ovos cozidos, em embalagens de 4 ovos, sem casca, prontos a consumir. Seguros e práticos, ideais para sandes, saladas e pratos principais.



derovo GROUP

Figura A1 - Desdobrável produtos comercializados pelo GRUPO DEROVO (parte 1).

DOVO		ken natas	
Ovo Líquido Pasteurizado <ul style="list-style-type: none"> • Ovo Inteiro, Clara e Gema. • Embalagem 320ml (clara), 500g (ovo inteiro), 1kg (caixa 8 un.), 10kg, 20kg, 250kg e 1000kg BIB. 		Ovos Moles e Castanhas de Ovos <ul style="list-style-type: none"> • Ovos Moles: Embalagem 250g (caixa 6x250g), 500g (caixa 20 un.) e 1kg (caixa 40 un.). • Castanhas de Ovos: Embalagem 500g (caixa 25 un.) e 1kg (caixa 50 un.). 	
Ovo em Pó <ul style="list-style-type: none"> • Gema, Clara High Whip: Saco/Caixa 20kg. • Ovo Inteiro, Clara High Gel: Saco/Caixa 25kg. 		Pudins <ul style="list-style-type: none"> • Pudim de Ovos. • Embalagem de 800g (caixa 4 un.). 	
Ovo Cozido Pronto a Comer <ul style="list-style-type: none"> • Embalagem 4 unidades (caixa 6x4). • Embalagem 6 unidades (caixa 6x6). • Balde 24. 70. 		Tortilhas Prontas Refrigeradas <ul style="list-style-type: none"> • Tortilha de cebola e presunto - Caixa 12 un. x 200g. • Tortilha de bacon, cebola, chouriço e sem cebola - Caixa 6 un. x 500g. 	
Ovo em Spray <ul style="list-style-type: none"> • Ovo Inteiro. • Lata 300g (caixa 8 un. x 300g). 		Tortilhas Frescas <ul style="list-style-type: none"> • Tortilha de Cebola. • Caixa 6 un. x 600g. 	
Creme Doce <ul style="list-style-type: none"> • Creme Doce: Balde 1,9kg e 7kg. • Creme Doce Pastelaria: Balde 7kg. • Creme Doce Cobertura: Balde 7kg. • Massa de Ovo Dura: Balde 7kg. • Massa de Gema Dura: Balde 7kg. 		Omeletes Prontas Congeladas <ul style="list-style-type: none"> • Omelete Natural: Caixa 75 un. x 50g, 75 un. x 90g. • Omelete Queijo, Milho/Salsão, Cogumelos/Ervas, Queijo/Bacon: Caixa 75 un. x 90g. 	
Fios, Capas e Trouxas de Ovos <ul style="list-style-type: none"> • Fios de Ovos: Embalagem 150g (caixa 4x150g). 1kg. • Capas de Ovos: Embalagem 1kg. • Trouxas de Ovos: Embalagem 250g (caixa 4x250g), Embalagem 1250g (20 un.). 		Pastas Para Barrar <ul style="list-style-type: none"> • Pasta de Atum, Delícias do Mar e Frango. • Caixas 6 un. x 250g, 6 un. x 450g, e 6 un. x 1000g. 	
		Ken 38% <ul style="list-style-type: none"> • Ken Nata 38%. • Embalagem 1 L (caixa 12 un.). 	
		Ken Láctea <ul style="list-style-type: none"> • Ken Nata Láctea 35%. • Ken Nata Láctea Apucarada - Sugar. • Embalagem 1 L (caixa 12 un.). 	
		Ken Clássica <ul style="list-style-type: none"> • Ken Clássica. • Embalagem 2 L (caixa 6 un.). 	
		Ken Base <ul style="list-style-type: none"> • Ken Base. • Embalagem 2 L (caixa 6 un.). 	
		Ken Enriquecido <ul style="list-style-type: none"> • Ken Enriquecido com Nata (ECN). • Embalagem 1 L (caixa 12 un.). 	
		Ken Nata Culinária <ul style="list-style-type: none"> • Ken Nata Culinária. • Embalagem 1 L (caixa 12 un.). 	
		Ken UHT <ul style="list-style-type: none"> • Ken Culinário UHT. • Ken Apucarada UHT - Presto. • Ken Gourmet Cuisine UHT. • Embalagem 1 L (caixa 12 un.). 	
		Ken Nata Spray <ul style="list-style-type: none"> • Ken Nata Spray. • Embalagem 500g (caixa 9 un.). 	
		Ken Trufa <ul style="list-style-type: none"> • Ken Trufa. • Embalagem 2,3 Kg (caixa 6 un.). 	
<p>Todas as referências de Natas podem ser fornecidas em BIB 10kg.</p>			

Figura A2 - Desdobrável produtos comercializados pelo GRUPO DEROVO (parte 2).

Anexo B – Fluxograma produtivo de ovoprodutos líquidos, adaptado de Agência Portuguesa do Ambiente (2011)

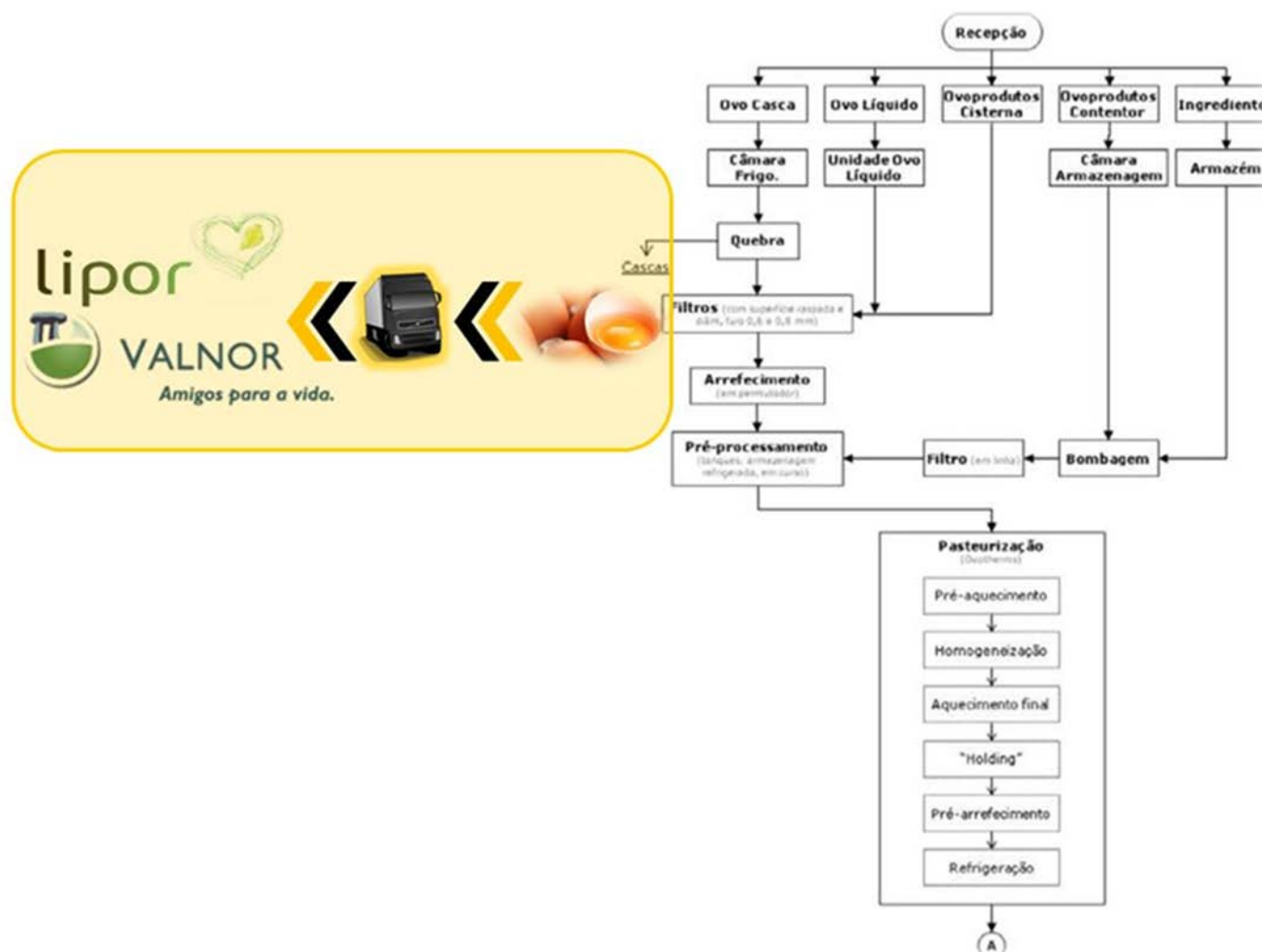


Figura B1 - Fluxograma produtivo de ovoprodutos líquidos na DEROVO – DERIVADOS DE OVOS S.A. (parte 1).

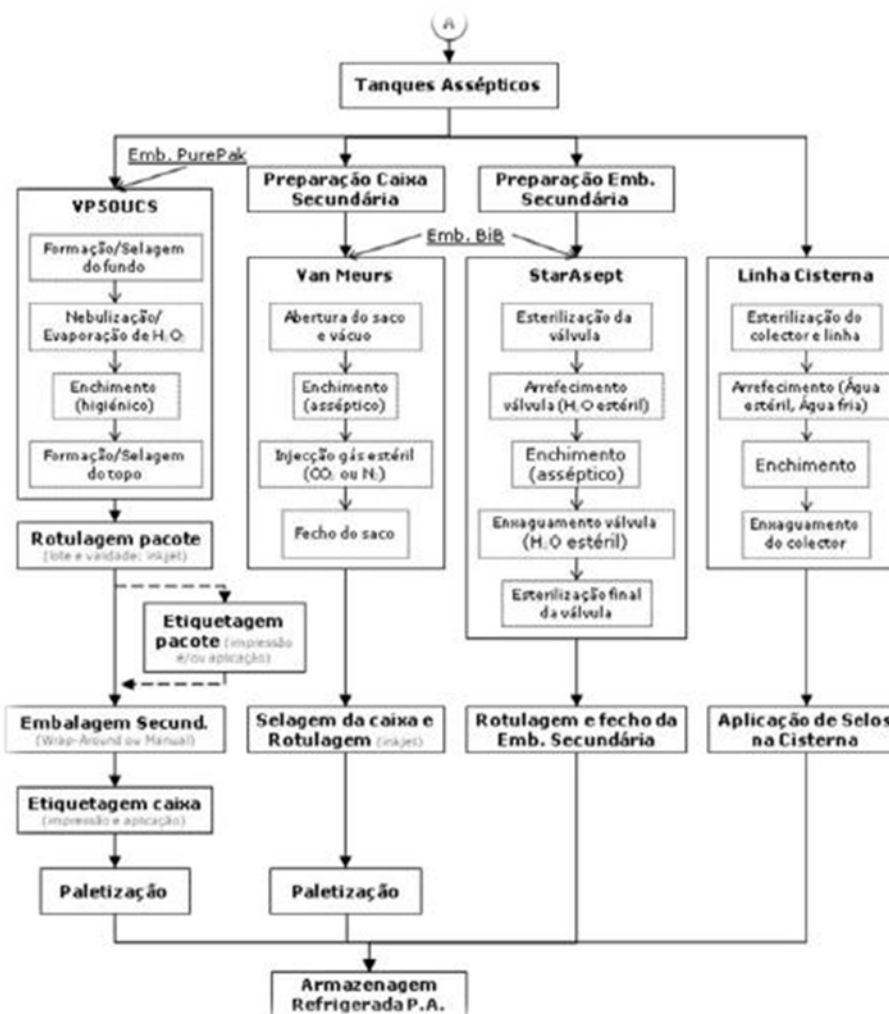


Figura B2 - Fluxograma produtivo de ovoprodutos líquidos na DEROVO – DERIVADOS DE OVOS S.A. (parte 2).

Anexo C – Fluxograma produtivo de ovo cozido, adaptado de Agência Portuguesa do Ambiente (2011)

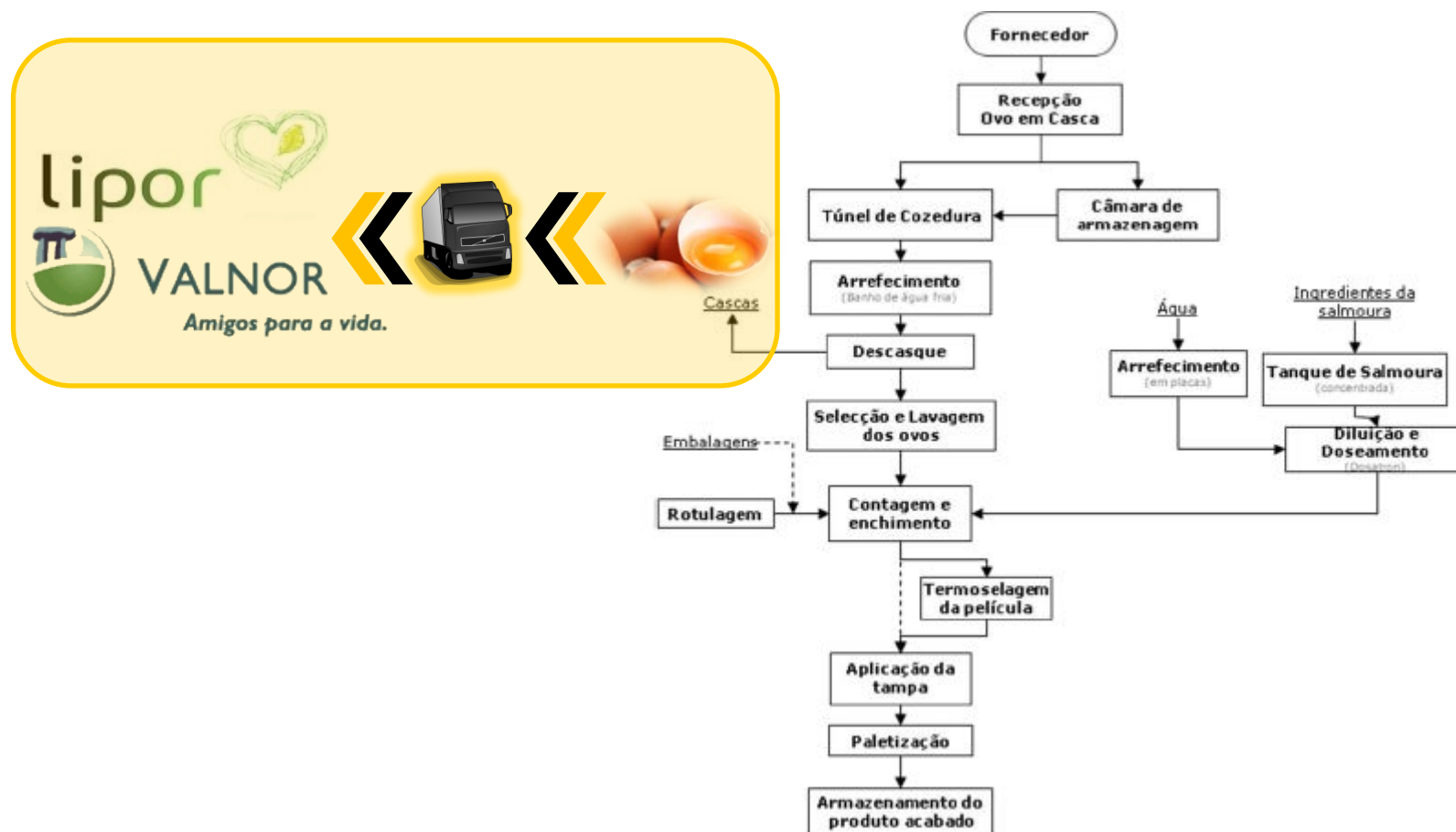


Figura C1 - Fluxograma produtivo de ovo cozido na DEROVO – DERIVADOS DE OVOS S.A.

Anexo D – Preparação dos meios de cultura necessários para a caracterização microbiológica da casca de ovo e de BPW

D1.COLI ID-F e VRBG-F, ambos os meios da bioMérieux®:

O COLI ID-F e o VRBG-F (meios prontos a usar) necessitaram apenas de uma simples preparação da gelose. Primeiramente desenroscou-se a cápsula do frasco da gelose e colocou-se o frasco a regenerar num banho-maria sensivelmente 45 minutos, de forma a derreter a gelose. Depois retirou-se o frasco do banho-maria, com a utilização de luvas de proteção contra riscos térmicos, fechou-se a cápsula e procedeu-se à homogeneização. Por fim, colocou-se o frasco numa estufa a $48,0 \pm 0,4$ °C até à sua utilização, sem exceder 6h.

D2.BP RPF (bioMérieux®, Lyon, França):

No que se refere à preparação do meio BP RPF, inicialmente desenroscou-se a cápsula do frasco de gelose de base R1 (*Baird Parker*) e derreteu-se a gelose num banho-maria a ferver, aproximadamente 45 minutos. Findado este tempo, retirou-se o frasco do banho-maria, mediante a utilização de luvas de proteção contra riscos térmicos, fechou-se a cápsula e procedeu-se à homogeneização. De seguida colocou-se o frasco numa estufa a $48,0 \pm 0,4$ °C até à sua utilização. Para a reconstituição, foram adicionados 10 ml de água destilada estéril num frasco de R2 (suplemento de RPF) e misturou-se cuidadosamente até à dissolução completa. Finalmente transferiu-se o conteúdo do frasco R2 para o frasco R1 e homogeneizou-se devidamente. O meio Baird Parker RPF foi imediatamente utilizado.

D3.PCA (Biokar®, Allonnes, França):

Num frasco dissolveu-se $5,13 \pm 0,01$ g de meio desidratado (BK144) em 250 ml de água destilada e agitou-se suavemente, com constante agitação, até à completa dissolução. De seguida os frascos foram esterilizados na autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Depois desta etapa de esterilização, os frascos de *schott* de 250 ml foram colocados a 6 – 8 °C no máximo de 90 dias. O frasco foi posteriormente colocado a regenerar num banho-maria. Após 45 minutos retirou-se o frasco do banho-maria, com a utilização de luvas de proteção contra riscos térmicos, fechou-se a cápsula, procedeu-se à homogeneização e colocou-se o frasco numa estufa a $48,0 \pm 0,4$ °C até à sua utilização, sem exceder 6h.

D4.RBCA (Oxoid®, Southampton, Reino Unido):

Em cada frasco dissolveu-se $6,4 \pm 0,01$ g de meio desidratado em 200 ml de água destilada e procedeu-se à devida homogeneização, até à completa dissolução. Depois os frascos foram devidamente esterilizados a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Após o término da esterilização, os frascos foram retirados da autoclave e, após arrefecerem, foram armazenados a $6 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ no máximo de 90 dias.

Com a finalidade de colocar o meio nas placas, desenroscou-se previamente a tampa do frasco e colocou-se o frasco a fundir num banho-maria aproximadamente 45 minutos. Depois retirou-se o frasco do banho-maria, mediante a utilização de luvas de proteção contra riscos térmicos, fechou-se a cápsula e procedeu-se à homogeneização. Seguidamente, na câmara de fluxo laminar, o meio foi depositado em diversas placas de Petri. Após o devido arrefecimento das placas, estas foram colocadas a $6 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$, no máximo de 31 dias até à devida utilização.

D5.Agar seletivo para *Enterococcus* (Merck®, Darmstadt, Alemanha):

Em cada frasco dissolveu-se $8,30 \pm 0,01$ g do meio desidratado em 200 ml de água destilada e agitou-se lentamente até à dissolução completa. Os frascos foram armazenados a $6 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ no máximo de 90 dias.

Para colocar o meio nas placas, desenroscou-se previamente a tampa do frasco e colocou-se o frasco a fundir num banho-maria aproximadamente 45 minutos. Depois retirou-se o frasco do banho-maria com a utilização de luvas de proteção contra riscos térmicos, fechou-se a cápsula e procedeu-se à homogeneização. Seguidamente, na câmara de fluxo laminar, o meio foi depositado em diversas placas de Petri. Após o devido arrefecimento das placas, estas foram colocadas a $6 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$, no máximo de 31 dias até à devida utilização. Uma importante consideração a fazer é que este meio não pode ser colocado a esterilizar na autoclave, pois não aguenta a pressão.

D6.Preparação BPW:

A água peptonada foi preparada com base nas instruções do fornecedor. Dissolveu-se $127,5 \pm 0,01$ g de meio desidratado BK018 (Biokar®, Allonnes, França) em 5l de água destilada. Agitou-se lentamente, de forma a ocorrer a dissolução completa. Seguidamente colocou-se 225 ml de BPW por frasco e procedeu-se à esterilização em autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. O BPW foi armazenado a $6 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Anexo E – Princípio de funcionamento do mini VIDAS®

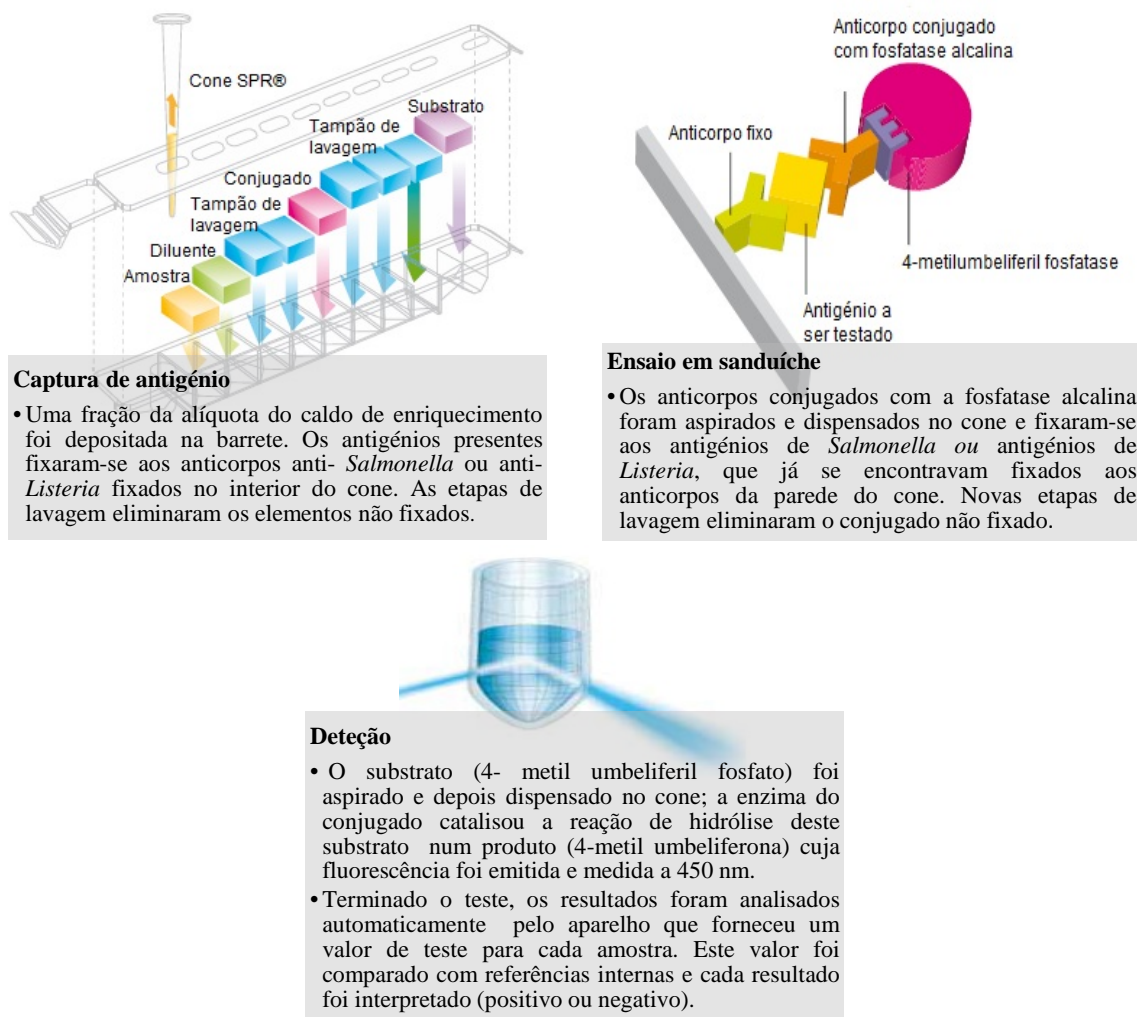


Figura E1 - Esquema ilustrativo do princípio de funcionamento do método VIDAS®*Salmonella* e VIDAS®*Listeria*, adaptado de Biomérieux Industry (2014).

O cone SPR® (**Figura E2**) foi sensibilizado na altura do fabrico com anticorpos específicos dos antígenos de superfície da *Salmonella* ou da *Listeria*, dependendo se o teste a se realizar foi o VIDAS®*Salmonella* ou VIDAS®*Listeria* respetivamente.

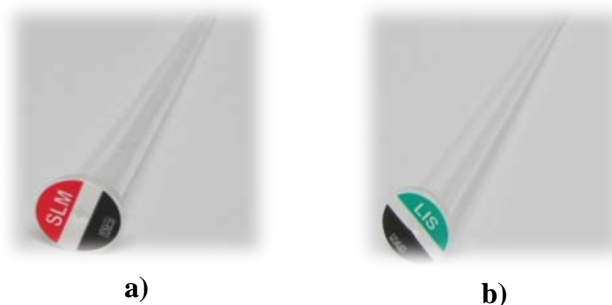


Figura E2 - Cone SPR® descartável, serviu tanto de fase sólida como de suporte de pipetagem. O interior do cone estava coberto com anticorpos **a)** anti-*Salmonella* **b)** anti-*Listeria*, adsorvidos na sua superfície.

As barretes, ilustradas na **Figura E3**, devidamente compostas por 10 poços cobertos por uma folha de alumínio selada e etiquetada. O primeiro poço, com uma parte perfurada, simplificou a introdução da amostra e o último poço consistia numa cuvete que permitia a leitura em fluorimetria. Os poços intermédios continham diferentes reagentes necessários à deteção (ver **Tabela E1**).



a)



b)

Figura E3 - Barrete de a) *Salmonella* b) *Listeria*.

Tabela E1 – Descrição das barretes, com descrição dos diversos reagentes necessários à análise.

Poço (s)	Reagente (s)
1	Poço amostra: introduzir 500 µl de caldo de enriquecimento, de calibrador ou de controlo.
2	Tampão de pré-lavagem (400 µl): TRIS - NaCl (150 mmol/l) - Tween pH 7,6 + conservante.
3 - 4 - 5 - 7 - 8 - 9	Tampão de lavagem (600 µl): TRIS - NaCl (150 mmol/l) - Tween pH 7,6 + conservante.
6	Conjugado (400 µl): anticorpos anti - <i>Salmonella</i> ou anti - <i>Listeria</i> marcados com fosfatase alcalina + conservante.
10	Cuvete de leitura com substrato (300 µl): 4-metil-umbeliferil-fosfato (0,6 mmol/l) + dietanolamina (DEA) (0,62 mol/l, ou seja, 6,6%, pH 9,2) + conservante.

Anexo F – Calibração – Recalibração do mini VIDAS®

Num teste qualitativo, o resultado foi interpretado comparando um “valor teste” com um ou dois valores-limites que se introduziram no mini VIDAS®.

Os reagentes VIDAS estavam pré-calibrados. No momento de receção de um novo lote, a curva de calibração foi introduzida (dados de fabrico) sob a forma de código-de-barras (cartão MLE). De seguida o calibrador foi passado para calcular novamente esta curva. Os controlos doseados na mesma série permitiram validar a nova calibração. Só foi necessário efetuar uma nova calibração a cada 14 dias, para tal usou-se um calibrador incluído na embalagem do reagente (bioMérieux SA, 2005).

```

mini VIDAS Listagem
DEROVO
Seção: A
Completo: 15:22:00 09Abr15
Tecn.: ESTAGIAR
Salmonella (SLM)
Vers.: R5.6.0
Lot.: 151002-0
Std. utiliz.:
Completo: 15:22:00 09Abr15
RFV = 3939
VT Negativo < 0.23
VT Positivo >= 0.23

-----
Posição: A1 Standard 1
Branco: 137 RFV: 3942
Posição: A2 Standard 1
Branco: 143 RFV: 3937
Posição: A3 Controlo 1
Branco: 140 RFV: 4775
VT: 1.21 Resultado: Positivo
Posição: A4 Controlo 2
Branco: 140 RFV: 90
VT: 0.02 Resultado: Negativo

```

Figura F1 - Relatório de teste impresso após validação da calibração do mini VIDAS® *Salmonella*, com indicação dos standards, controlo positivo e controlo negativo.

Anexo G – Procedimentos experimentais para a deteção de *Salmonella* e de *Listeria*

G1. Deteção de *Salmonella*:

Com a finalidade de se efetuar o pré-enriquecimento, adicionaram-se, nas devidas condições de assepsia, 25 g da amostra a um frasco de *schott* de 225 ml de BPW, procedeu-se à homogeneização e colocou-se a incubar na estufa a $37,0 \pm 0,1$ °C durante 24 ± 2 h. Após o término desta incubação, seguiu-se a etapa de enriquecimento. Para tal, transferiram-se 100 µl da suspensão para 10 ml de caldo SX2 (bioMérieux®, Lyon, França) e incubou-se por 24 ± 2 h na estufa a $42,0 \pm 0,1$ °C. Findado o tempo de incubação procedeu-se à homogeneização do caldo SX2, transferiram-se 500 µl do caldo SX2 para o poço-amostra da barrete e aqueceu-se durante 15 ± 1 minutos a $131,0 \pm 0,5$ °C no VIDAS® Heat and Go, que esteve previamente a aquecer durante aproximadamente 1 h de forma a estabilizar o aparelho. Seguidamente retirou-se a barrete e deixou-se arrefecer durante 10 minutos. Depois desta etapa de arrefecimento efetuou-se o teste VIDAS® *Salmonella*.

G2. Deteção de *Listeria*:

Com o intuito de realizar o pré-enriquecimento, adicionaram-se assepticamente 25 g da amostra de casca e 225 ml de caldo FRASER-1/2- MNB (bioMérieux®, Lyon, França) num saco Stomacher®. A homogeneização foi efetuada mediante a utilização do homogeneizador (Stomacher® 400 Circulator, Brighton, Reino Unido), seguida de incubação por 24 ± 2 h a $30,0 \pm 0,1$ °C. Após o pré-enriquecimento, transferiu-se 1,0 ml da suspensão para 10,0 ml de caldo FRASER-T (bioMérieux®, Lyon, França) e colocou-se a incubar durante 24 ± 2 h a $30,0 \pm 0,1$ °C. No fim da incubação, homogeneizou-se o caldo de enriquecimento e transferiram-se 500 µl para o poço-amostra da barrete. Posteriormente a barrete foi aquecida durante 15 ± 1 minutos a $131,0 \pm 0,5$ °C no VIDAS® Heat and Go, que esteve previamente a aquecer aproximadamente 1h. A barrete foi retirada do VIDAS® Heat and Go e deixou-se arrefecer aproximadamente 10 minutos. De seguida efetuou-se o teste VIDAS® utilizando o equipamento mini VIDAS®, que possibilita e simplifica a deteção de *Listeria*.

Anexo H – Matérias-primas de origem animal para alimentação animal

Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB)

A EEB é uma doença neurodegenerativa que afeta o gado doméstico bovino. A doença surgiu em meados dos anos 80 na Inglaterra, na sequência de alterações aos processos de processamento de farinha de carne e ossos (FCO), o que permitiu a sobrevivência do agente etiológico em carcaças infetadas, com consequente contaminação daquela matéria-prima e infeção dos bovinos alimentados com alimentos compostos que a incorporavam.

A EEB tem como característica o facto de ter como agente patogénico uma forma especial de proteína, chamada prião. É transmissível ao homem, causando uma doença semelhante, a nova variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob, abreviadamente vCJD.



• A utilização de proteínas de origem animal em alimentação animal está interdita, à exceção de algumas derrogações, de acordo com as condições legalmente previstas pelo Anexo IV do Reg. (CE) n.º 999/2001.

• A aplicação das derrogações consideradas obriga a uma autorização prévia por parte da Autoridade Nacional Competente.

• As proteínas de origem animal autorizadas em alimentação animal, nomeadamente os subprodutos animais e produtos derivados não destinados ao consumo humano, devem obedecer às regras sanitárias previstas no Reg. (CE) n.º 1069/2009, implementado pelo Reg. (UE) n.º 142/2011, em termos da categorização das matérias a utilizar, processamento, transporte, colocação no mercado e utilização.

• Mais devem ser cumpridas as disposições de rotulagem e as comunicações mensais obrigatórias estabelecidas pelo D.L. n.º 76/2003, como medidas complementares de luta contra a EEB no domínio da alimentação animal.



Proibição de Proteínas de Origem Animal em Alimentação Animal

Com vista à proteção da saúde humana e animal em relação ao risco de EEB, foram adotadas diversas medidas para a sua prevenção e erradicação, nomeadamente a interdição de alimentar determinadas categorias de animais com certos tipos de proteínas animais.

É, assim, proibido alimentar ruminantes com proteínas provenientes de animais, tendo mesmo em consideração que estas não fazem parte da alimentação natural dos animais adultos. Esta proibição é extensiva a outros animais não ruminantes, pese embora seja permitido alimentar não ruminantes com certas proteínas animais transformadas de não ruminantes sob condições específicas e assegurar a interdição da reciclagem intra-espécies.

Produção, Colocação no Mercado e Utilização

A produção, rotulagem, armazenamento, transporte, colocação no mercado e utilização de alimentos para animais que consistam ou contenham proteínas de origem animal, devem obedecer aos requisitos legais em vigor.

Mais estão os operadores obrigados à autorização prévia por parte da DGAV para a aplicação das derrogações legalmente previstas, bem como às comunicações obrigatórias mensais de produção, intermediação e utilização, estabelecidas como medidas complementares de luta contra a EEB no domínio da alimentação animal.

Proteínas de origem animal em alimentação animal





Feed ban

Legislação aplicável ***

- Reg.(CE) n.º 999/2001, de 22 de maio
- Reg.(CE) n.º 1069/2009, de 21 de outubro
- Reg.(EU) n.º 142/2011, de 25 de fevereiro
- D.L. n.º 76/2003, de 19 de abril

*** ter em consideração as respetivas versões consolidadas

Direção de Serviços de Nutrição e Alimentação
Divisão de Alimentação Animal
Tapada da Ajuda - Edifício 1, Piso 6
1349 - 018 Lisboa
Telefone: 213 613 200 Fax: 213 613 258

Direção Geral de Alimentação e Veterinária
Campo Grande, n.º50
1700-093 Lisboa
213 239 500 213 239 501 dirgeral@dgav.pt

Direção Geral de Alimentação e Veterinária
www.dgav.pt


 

Figura H1 - Desdobrável DGAV (página 1).

<p>Matérias-Primas de Origem Animal em Alimentação Animal</p> <ul style="list-style-type: none"> A utilização de proteínas de origem animal está interdita em alimentação animal; Contudo prevêem-se derrogações e disposições específicas relativas à sua aplicação; Em qualquer dos casos deverá ser sempre assegurada a proibição da reciclagem intra-espécies. <p>Na alimentação de animais utilizados na alimentação humana, qualquer que seja a espécie animal visada, só estão autorizadas matérias-primas de origem animal classificadas enquanto:</p> <ul style="list-style-type: none"> Matérias de categoria 3, desde que satisfaçam os requisitos estabelecidos em i) da alínea d) do artº 14º do Reg. (CE) n.º 1069/2009. <p>Na alimentação de animais não utilizados na alimentação humana, podem ser utilizadas matérias-primas de origem animal classificadas enquanto:</p> <ul style="list-style-type: none"> Matérias de categoria 3 que satisfaçam os requisitos estabelecidos em ii), iii) e iv) da alínea d), e da alínea e), ambas do artº 14º do Reg. (CE) n.º 1069/2009; Matérias de categoria 2 ou 1, segundo as disposições do artº 18º do Reg. (CE) n.º 1069/2009, nomeadamente desde que destinadas a utilizações específicas e mediante autorização prévia da Autoridade Competente Nacional – DGAV. 									
<p>Tabela de Matérias-Primas de Origem Animal em Alimentação Animal - Interdições, Autorizações e Respetivas Restrições</p>									
	BOVINOS	PEQUENOS RUMINANTES	SUÍNOS	AVES	EQUINOS	PEIXES	ANIMAIS COMPANHIA	ANIMAIS PELES COM PELO	ANIMAIS ZOO
PAT (Ruminantes)									
PAT (Não Ruminantes)						SÓ MONOGÁSTRICOS	PROIBIDA RECICLAGEM INTRA-ESPÉCIES	PROIBIDA RECICLAGEM INTRA-ESPÉCIES	PROIBIDA RECICLAGEM INTRA-ESPÉCIES
GELATINA (Ruminantes)									
GELATINA (Não Ruminantes)									
PDS (Ruminantes)									
PDS (Não Ruminantes)									
FARINHA SANGUE (Não Ruminantes)						PROIBIDA RECICLAGEM INTRA-ESPÉCIES	PROIBIDA RECICLAGEM INTRA-ESPÉCIES	PROIBIDA RECICLAGEM INTRA-ESPÉCIES	PROIBIDA RECICLAGEM INTRA-ESPÉCIES
PROTEÍNAS HIDROLISADAS (Não Ruminantes)									
COUBOS E PELES (Ruminantes)									
FARINHA PEIXE	SÓ LEITES SUBSTITUIÇÃO	SÓ LEITES SUBSTITUIÇÃO				PROIBIDA RECICLAGEM INTRA-ESPÉCIES			
POSFATO DI E TRICÁLCICO									
LEITES E DERIVADOS									
OVOS E OVOPRODUTOS									
<p>PAT - Proteínas Animais transformadas; PDS - Produtos derivados do sangue</p>									
		PROIBIDO			AUTORIZADO			AUTORIZADO COM RESTRIÇÕES	

Figura H2 - Desdobrável DGAV (página 2).

Anexo I – Possibilidade de tratamento da casca de ovo considerando as quantidades geradas pela empresa. Características, preço e condições de pagamento do Shell Dryer R200 (OVOBEL®, BRUGES, BÉLGICA)



Equipment and Engineering for Egg Processing/DEROVO OFFER – 014308 – SHELL DRYER R200

ROTARY OVEN MODEL R 200

One Rotary Egg Shell Dryer, capacity: up to 534kg/h with:

Wet egg shells maximum water content wet basis 16%
Dried to approx. 1% water content
Temperature in: (air) 400-700 degrees C
Temperature out: (air) 90-120 degrees C
Specific energy consumption: 950 - 1000 Kcal/kg removed water
Density shells after drying v/ <1% H₂O: 1139 kg/m³

Item 1: CR 100 Drum and Exhaust.

Drum: Ø 800 mm inside with carrier. L.: 5,0 m.
2 pc. Drum wheels and 4 pc roller and rotation guard
Drum motor: 5,5 kW
Drum is insulated with 50 mm screen mat ALU S100
Exhaust chamber: With inspection door, safety switch and 1pc. PT 100 sensor. Not insulated
Rotary valve: ABS 250, Motor 0.37 kW
Rack: Built on frame made of profile pipes.
Fan: AVD 7.5, Motor 5,5 kW
Cyclone: Ø 700 mm.
Rotary Valve: CL 200, motor 0.37 kW

Item 2: Furnace

Type: Furnace with inlet and chock buster, pneumatic
Capacity: For energy input effect 35 - 200 kW
Process air: 3000 m³/h
Lined with 150 mm ceramic fibre
Dimensions: Ø 1.300 x L: 1.000 mm
Burner: Weishaupt burner:
WG20 N/1-A, control box built-in

Item 3: Switchboard

Steel panel on wall with bottom cable exit H x B x D
600 x 800 x 300 mm. Mimic diagram on front panel containing:
1 pc. Main interrupter 40A - 3 x 400/230V+PE
1 pc. Soft start module 5.5 kW for drum
3 pc. Motor module, direct start
1 pc. Timer module for cooling time and empty running
1 pc. Emergency stop relay for speed guard, safety switch
1 pc. Digital instrument for showing of furnace temperature
- built in/built together by buyers gas regulator.
- Interlocking with gas burner, inlet and outlet conveyors
- The dryer is controlled by a micro controller with text display built in
- Electrical - documentation in English.

Total price excl. VAT EUR 102.600,00

Page 1 of 2

Figura I1 - Proposta apresentada pela OVOBEL® (página 1).



EQUIPMENT AND ENGINEERING FOR EGG PROCESSING/DEROVO

OFFER – 014308 – SHELL DRYER R200

TERMS & CONDITIONS**PAYMENT TERMS:**

- 40% down payment
- 60% balance before shipment

DELIVERY TIME:

Ex-works, 3 – 4 months from receipt of down payment confirmed by our banker.



Figura I2 - Proposta apresentada pela OVOBEL® (página 2).

Anexo J – Cálculos para determinação da composição da ração com incorporação de casca de ovo: *PrOvo*

Para determinar a composição da ração *PrOvo* foi necessária a informação contida na **Tabela J1** e os cálculos foram efetuados considerando uma incorporação de 3% de casca de ovo na farinha da FERREIRA AVES LDA.

Tabela J1 - Composição do Produto Transformado (FERREIRA AVES LDA.) e da Casca de Ovo (DEROVO – DERIVADOS DE OVOS S.A.).

Composição	Produto Transformado (FERREIRA AVES LDA.)	Casca de ovo (DEROVO – DERIVADOS DE OVOS S.A.)
Proteína (%)	53,7	1,9% Colagénio (*) 19% Proteína total (*)
Gordura total (%)	34,1	-
Humidade (%)	8,0	13,8 (**)
Cinza total (%)	5,8	78,4
Cálcio (%)	1,4	31,0
Fósforo (%)	0,99	0,04

(*) – Parâmetros determinados apenas para as membranas.

(**) – Média da humidade da casca esterilizada (133°C, 15 min).

J1. Cálculos com base nos parâmetros conhecidos:

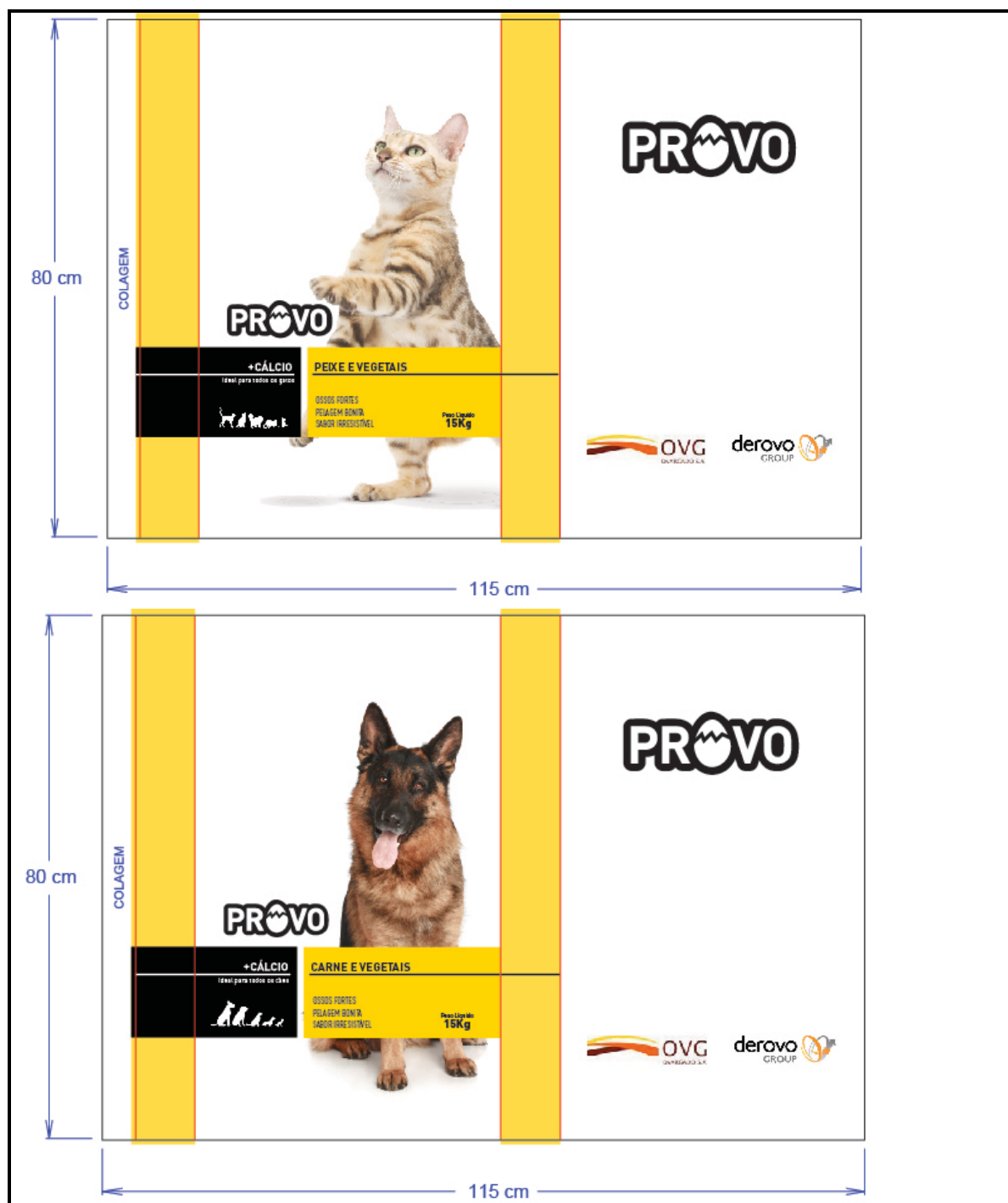
$$\text{Proteína} = (0,97 \times 53,7) = 52,1\%$$

$$\text{Gordura total} = (0,97 \times 34,1) = 33\%$$

$$\text{Humidade} = (0,97 \times 8,0) + (0,03 \times 13,8) = 8,2\%$$

$$\text{Cinza total} = (0,97 \times 5,8) + (0,03 \times 78,4) = 8\%$$

$$\text{Fósforo} = (0,97 \times 0,99) + (0,03 \times 0,04) = 0,96\%$$

Anexo K – Planificação das embalagens *PrOvo*Figura K1 - Protótipo das embalagens – ração *PrOvo*.

Anexo L – Relatórios impressos pelo mini VIDAS® na deteção de *Salmonella* spp. em amostras de casca triturada e esterilizada

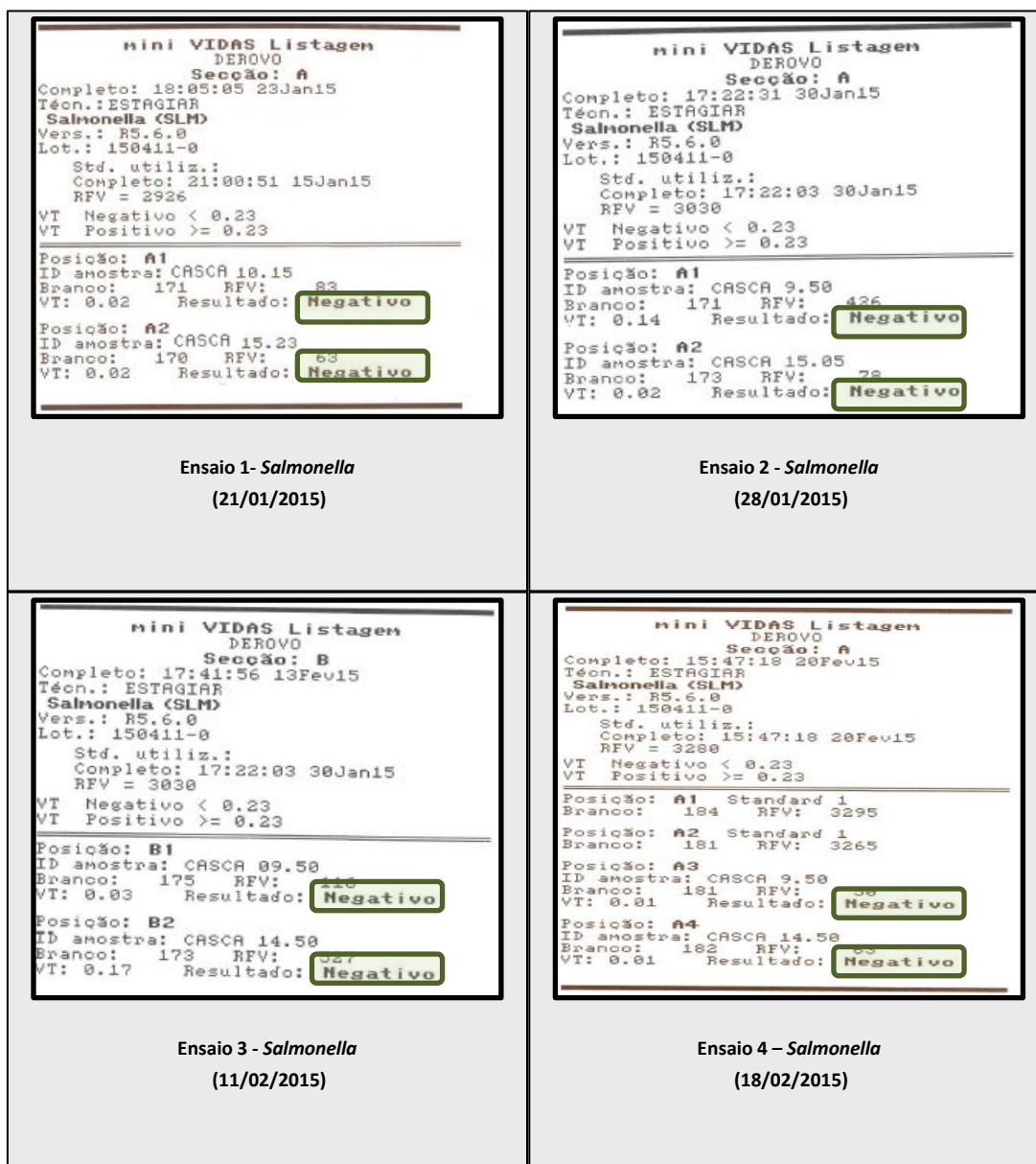


Figura L1 - Deteção de *Salmonella* - resultados dos ensaios 1 a 4 impressos pelo mini VIDAS®.

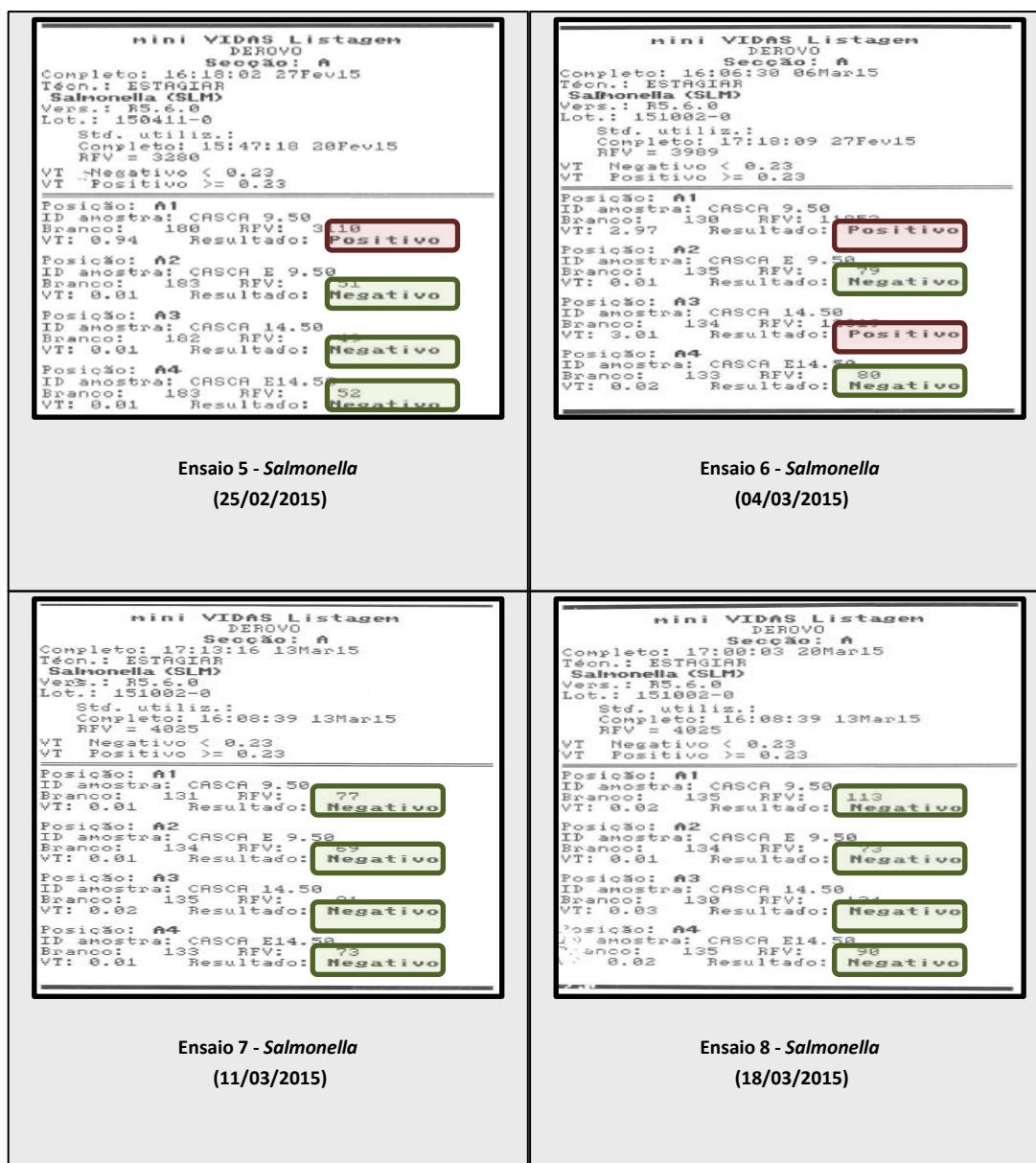


Figura L2 - Detecção de *Salmonella* - resultados dos ensaios 5 a 8 impressos pelo mini VIDAS®.

mini VIDAS Listagen
DEROVO

Completo: 16:29:30 27Mar15
Tecn.: ESTAGIAR
Salmonella (SLM)
Vers.: R5.6.0
Lot.: 151002-0

Std. utiliz.:
Completo: 16:29:30 27Mar15
RFV = 3890

VT Negativo < 0.23
VT Positivo >= 0.23

Posição: A1 Standard 1
Branco: 137 RFV: 3864

Posição: A2 Standard 1
Branco: 136 RFV: 3917

Posição: A3
ID amostra: CASCA 9.50
Branco: 134 RFV: 72
VT: 0.01 Resultado: **Negativo**

Posição: A4
ID amostra: CASCA E 9.50
Branco: 133 RFV: 67
VT: 0.01 Resultado: **Negativo**

Posição: A5
ID amostra: CASCA 14.50
Branco: 137 RFV: 104
VT: 0.02 Resultado: **Negativo**

Posição: A6
ID amostra: CASCA E14.50
Branco: 132 RFV: 85
VT: 0.02 Resultado: **Negativo**

Ensaio 9 - *Salmonella*
(25/03/2015)

mini VIDAS Listagen
DEROVO

Completo: 15:13:56 02Abr15
Tecn.: ESTAGIAR
Salmonella (SLM)
Vers.: R5.6.0
Lot.: 151002-0

Std. utiliz.:
Completo: 16:29:30 27Mar15
RFV = 3890

VT Negativo < 0.23
VT Positivo >= 0.23

Posição: A1
ID amostra: CASCA 9.50
Branco: 133 RFV: 11635
VT: 2.99 Resultado: **Positivo**

Posição: A2
ID amostra: CASCA E 9.50
Branco: 141 RFV: 78
VT: 0.02 Resultado: **Negativo**

Posição: A3
ID amostra: CASCA 14.50
Branco: 139 RFV: 103
VT: 0.13 Resultado: **Positivo**

Posição: A4
ID amostra: CASCA E14.50
Branco: 139 RFV: 87
VT: 0.02 Resultado: **Negativo**

mini VIDAS Listagen
DEROVO

Completo: 16:22:44 10Abr15
Tecn.: ESTAGIAR
Salmonella (SLM)
Vers.: R5.6.0
Lot.: 151002-0

Std. utiliz.:
Completo: 15:22:00 09Abr15
RFV = 3939

VT Negativo < 0.23
VT Positivo >= 0.23

Posição: A1
ID amostra: CASCA 9.50
Branco: 135 RFV: 91
VT: 0.02 Resultado: **Negativo**

Posição: A2
ID amostra: CASCA E 9.50
Branco: 135 RFV: 80
VT: 0.02 Resultado: **Negativo**

Posição: A3
ID amostra: CASCA 14.50
Branco: 138 RFV: 82
VT: 0.02 Resultado: **Negativo**

Posição: A4
ID amostra: CASCA E14.50
Branco: 136 RFV: 82
VT: 0.02 Resultado: **Negativo**

Ensaio 10 - *Salmonella*
(31/03/2015)

Ensaio 11 - *Salmonella*
(08/04/2015)

Figura L3 - Detecção de *Salmonella* - resultados dos ensaios 9 a 11 impressos pelo mini VIDAS®.

Anexo M – Relatórios impressos pelo mini VIDAS® na detecção de *Listeria spp.* em amostras de casca triturada e esterilizada

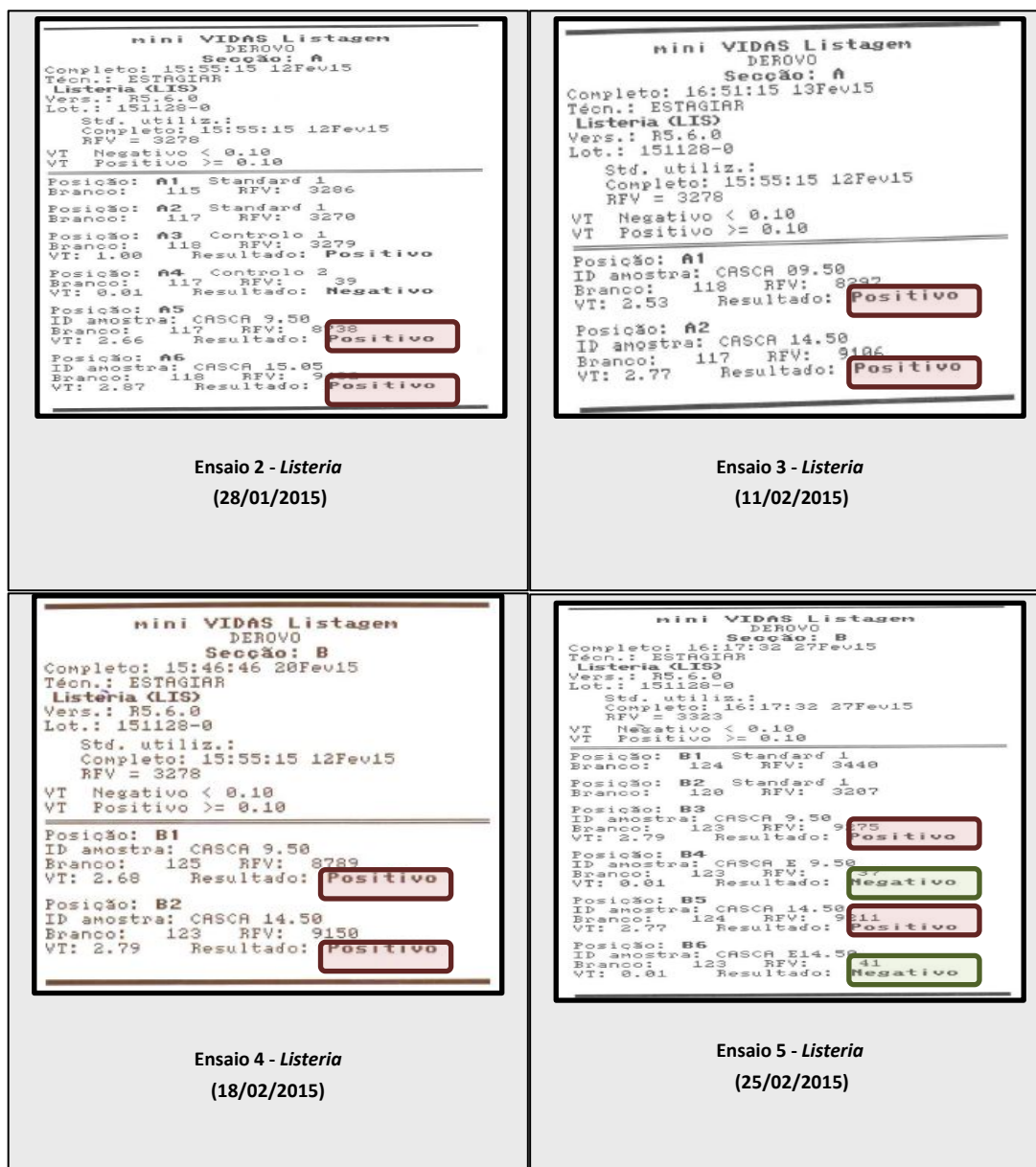


Figura M1 - Detecção de *Listeria*- resultados dos ensaios 2 a 5 impressos pelo mini VIDAS®. No primeiro ensaio de determinação de agentes patogénicos não se analisou a *Listeria*, por este motivo não se apresenta essa determinação.

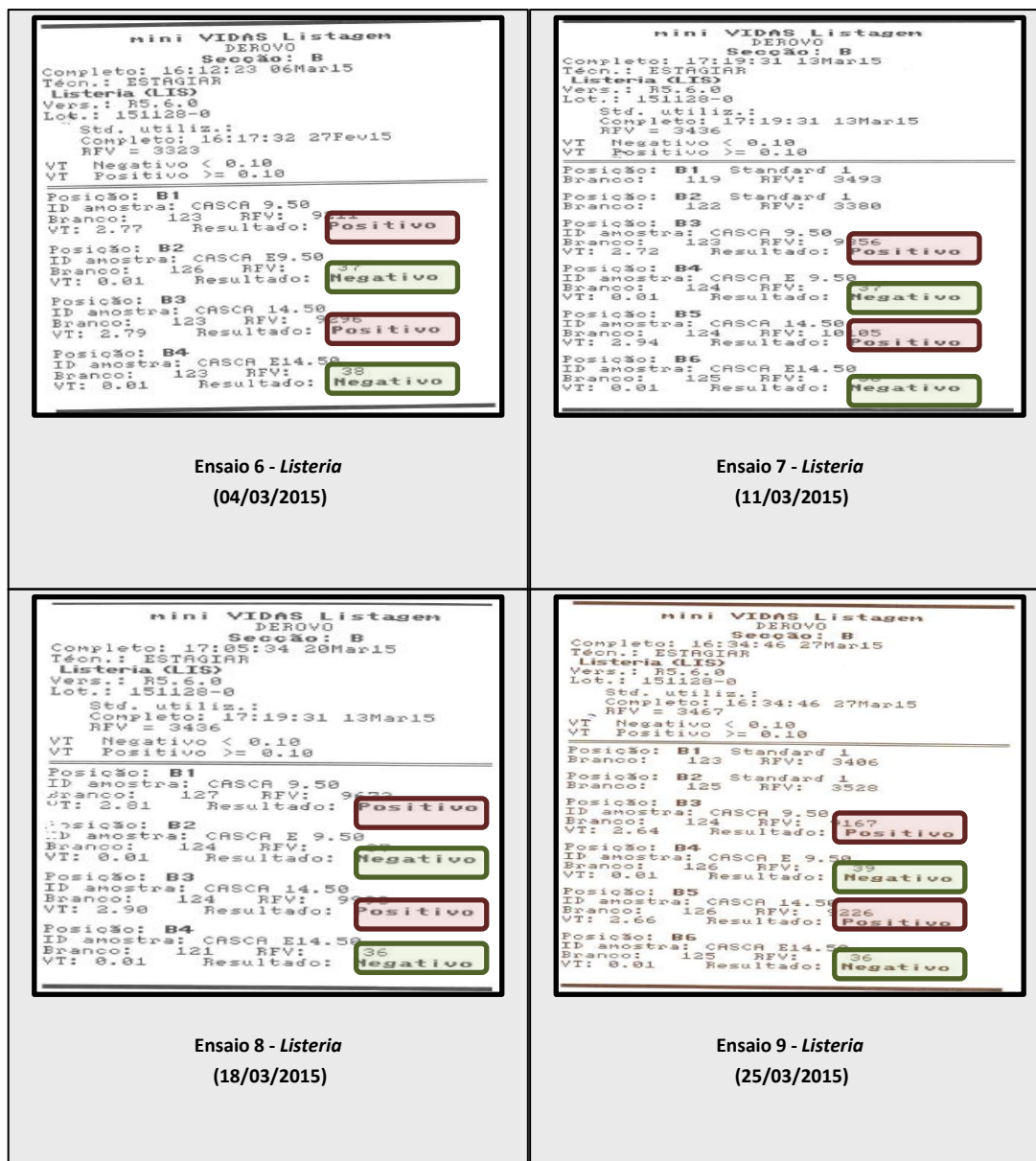


Figura M2 - Detecção de *Listeria*- resultados dos ensaios 6 a 9 impressos pelo mini VIDAS®.

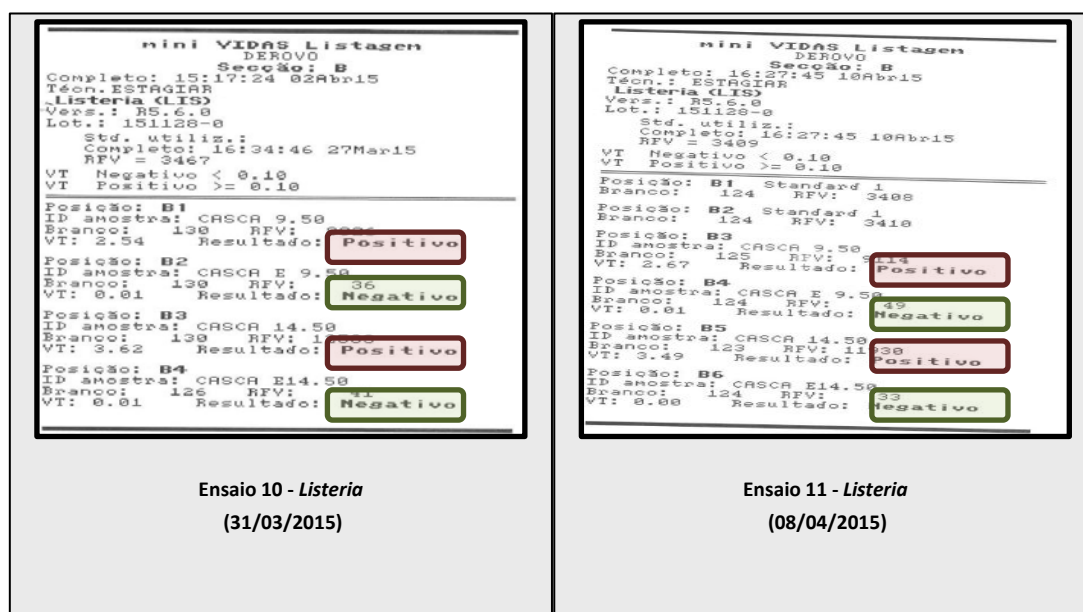


Figura M3 - Detecção de *Listeria*- resultados dos ensaios 10 e 11 impressos pelo mini VIDAS®.